

# **Nuevos compuestos citotóxicos de esponjas de Indonesia con naturaleza estructural diversa. Uso de técnicas avanzadas en la determinación de su estereoquímica relativa y absoluta.**

**Autor: Guillermo Tarazona Ramos**

---

Tesis doctoral UDC / 2017

Director: Dr. D. Rogelio Fernández Rodríguez

Director: Dr. D. Jaime Rodríguez González

Director: Dr. D. Carlos Jiménez González

Tutor: Dr. D. Jaime Rodríguez González

Programa de doctorado en Química Ambiental y Fundamental



UNIVERSIDADE DA CORUÑA





## Acta de Tesis

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidade da Coruña para calificar la tesis doctoral titulada “**Nuevos compuestos citotóxicos de esponjas de Indonesia con naturaleza estructural diversa. Uso de técnicas avanzadas en la determinación de su estereoquímica relativa y absoluta.**” dirigida por los Drs. Rogelio Fernández Rodríguez, Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González, presentada por D. **Guillermo Tarazona Ramos** y constituido en el día de la fecha por los miembros que subscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por ..... la calificación de:

En A Coruña, a..... de ..... de 2017

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

EL VOCAL

Firmado

Firmado

Firmado





Don Guillermo Tarazona Ramos:

Presenta la memoria adjunta, titulada **“Nuevos compuestos citotóxicos de esponjas de Indonesia con naturaleza estructural diversa. Uso de técnicas avanzadas en la determinación de su estereoquímica relativa y absoluta.”** para optar al grado de doctor en Química que ha sido realizado bajo la dirección de los doctores Rogelio Fernández Rodríguez, Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González en el laboratorio de Productos Naturales de PharmaMar S.A. y en los laboratorios del Departamento de Química Fundamental de la Universidade da Coruña.

A Coruña, a 01 de Junio de 2017.

Fdo. Guillermo Tarazona Ramos



Don **Rogelio Fernández Rodríguez**, Jefe de grupo del departamento de Productos Naturales en PharmaMar S.A., Don **Carlos Jiménez González**, Catedrático de Universidad, y Don **Jaime Rodríguez González**, Profesor Titular de Universidad, pertenecientes al Departamento de Química Fundamental (Área de Química Orgánica) de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

Certifican:

Que la memoria adjunta, titulada **“Nuevos compuestos citotóxicos de esponjas de Indonesia con naturaleza estructural diversa. Uso de técnicas avanzadas en la determinación de su estereoquímica relativa y absoluta.”** ha sido realizada bajo su dirección por el licenciado en Química Don **Guillermo Tarazona Ramos**, en el Área de Química Orgánica dependiente del Departamento de Química Fundamental.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizan su presentación en la Universidade da Coruña para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en A Coruña, a 01 de Junio de 2017.

A Coruña, a 01 de Junio de 2017.



A Bea y a Níco  
por su cariño y su  
apoyo incondicional



## **Agradecimientos**

Agradezco enormemente la paciencia, el apoyo y todo lo que me han enseñado a mis directores de tesis, Dr. Rogelio Fernández, Dr. Jaime Rodríguez y Dr. Carlos Jiménez. Sin ellos, todo este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Carmen Cuevas, directora de I+D de PharmaMar, por apoyarme a la hora de realizar la tesis, y permitirme seguir creciendo como investigador, y a PharmaMar por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Simon Munt, gerente de química médica, por la gran mejora y revisión de los trabajos publicados.

A la Dra. Marta Pérez, jefa del departamento de productos naturales, por haberme acogido durante estos años, y haber sido fundamental en la realización de esta tesis.

Al Centro de Supercomputación de la Xunta de Galicia (CESGA) por todos los cálculos computacionales realizados.

Al gobierno de Indonesia por permitir la recolección de las muestras estudiadas.

A mis compañeros del departamento de productos naturales, Alfredo, Carlos, Elena, Ada, Laura y Susana, por su gran apoyo y colaboración, y especialmente a mis amigos y compañeros de laboratorio Cris Crespo, Cris Lillo, Gonzalo y Patricia, que siempre han estado ahí cuando más lo he necesitado.

Al resto de departamentos de I+D de PharmaMar, que directa o indirectamente, han colaborado en algunos aspectos fundamentales de esta tesis, especialmente a Gema y a Paloma por su enorme ayuda con el mecanismo de acción de las bromotirosinas.

A todos los becarios que han “sufrido” mi tesis y me han aportado tanto durante estos años, especialmente a Manu, Johanna y Eydis.

A mis padres, a mi hermano y a mi familia, por su apoyo y cariño incondicional.

A Bea y a Nico, porque realmente ellos son los principales responsables de que todo esto haya sido posible. Sin sus ánimos, su apoyo y su cariño, nada de esto habría salido adelante.



## Resumen

La memoria que se presenta a continuación describe el estudio de seis esponjas procedentes de Indonesia de las cuales se han obtenido seis nuevas familias de compuestos con actividad citotóxica. Cabe destacar como parte más novedosa de esta tesis doctoral, que la aproximación a la elucidación estructural de las nuevas entidades aisladas se ha apoyado en la utilización conjunta de técnicas de resonancia magnética nuclear junto con cálculos computacionales basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT).

En el **Capítulo I**, a modo de introducción se pone en perspectiva el estado actual de los productos naturales de origen marino que están siendo desarrollados por la industria farmacéutica como fármacos en los diferentes mercados clínicos.

También se describe el *estado del arte* de las diferentes técnicas utilizadas en la determinación de la estructura de los compuestos aislados, poniéndose un mayor énfasis en el estudio de la estereoquímica relativa o absoluta. Estas técnicas serán utilizadas en los posteriores capítulos para la resolución de la estructura tridimensional de los nuevos compuestos descritos.

Con el fin de agilizar la lectura y que esta no resulte repetitiva, finalmente se esquematiza los diferentes procesos de separación y aislamiento a los que han sido sometidos todos los extractos de las esponjas estudiadas y que han dado lugar a los compuestos aislados.

En el **Capítulo II** se describe el estudio de la esponja *Hexadella* sp. de la cual se ha aislado un derivado citotóxico de bromotirosinas al que hemos llamado **anomoian B**.

El **Capítulo III** describe el estudio de la asociación de esponjas *Jaspis* sp. y *Bubaris* sp. de donde se aisló un nuevo derivado activo bromado al que hemos denominado **aplyzanzine B**. En este capítulo se detalla el mecanismo de acción de este nuevo metabolito junto al **anomian B** descrito en el capítulo anterior.

En el **Capítulo IV** se estudió la esponja *Theonella* sp. de la cual se aisló un nuevo compuesto natural, el **ácido lanesoico**, que presenta un esqueleto inusual de tetrahidropirimidina, combinado con la naturaleza de zwitteriónica de su estructura.

El **Capítulo V** recoge el aislamiento de nuevos análogos de la familia de los **enigmazoles** a partir de la esponja de la familia de las Neopeltidae. En este caso la utilización de diferentes derivatizaciones químicas fue clave para la resolución de la estereoquímica de estos compuestos con actividad citotóxica.

En el **Capítulo VI** se describe el aislamiento de las **halioxepines A, B y C** a partir de la esponja *Haliclona (Reniera)* sp., siendo necesario recurrir a cálculos computacionales para relacionar los diferentes “estereoclusters” presentes en las tres moléculas.

Por último, en el **Capítulo VII** se describe el aislamiento de un nuevo péptido cíclico **gunungamide A** y de cómo se puede aplicar el análisis configuracional basado en constantes de acoplamiento junto con el método avanzado de Marfey para facilitar la resolución de su estereoquímica tanto relativa como absoluta de los aminoácidos presentes en el esqueleto peptídico del compuesto. Esta nueva metodología combinada se aplicó también al compuesto conocido **stellatolide A**.

## Resumo

A memoria que se presenta a continuación describe o estudo de seis esponxas procedentes de Indonesia das cales se obtiveron seis novas familias de compostos con actividade citotóxica. Cabe destacar como parte máis nova de esta tese doutoral, que a aproximación á elucidación estrutural das novas entidades illadas apoiouse na utilización conxunta de técnicas de resonancia magnética nuclear xunto con cálculos computacionais baseados na teoría de funcionais de densidade (DFT).

No **Capítulo I**, a modo de introdución ponse en perspectiva o estado actual dos produtos naturais de orixe mariña que están a ser desenvolvidos pola industria farmacéutica como fármacos nos diferentes mercados clínicos.

Tamén se describe a estado *da arte* das diferentes técnicas utilizadas na determinación da estrutura dos compostos illados, poñéndose unha maior énfase no estudo da estereoquímica relativa ou absoluta. Estas técnicas serán utilizadas nos posteriores capítulos para a resolución da estrutura tridimensional dos novos compostos descritos.

Co fin de axilizar a lectura e que esta non resulte repetitiva, finalmente esquematízase os diferentes procesos de separación e illamento aos que foron sometidos todos os extractos das esponxas estudadas e que deron lugar aos compostos illados.

No **Capítulo II** descríbese o estudo da esponxa *Hexadella* sp. da cal illouse un derivado citotóxico de bromotirosinas ao que chamamos **anomoian B**.

O **Capítulo III** describe o estudo da asociación de esponxas *Jaspis* sp. e *Bubaris* sp. de onde illouse un novo derivado activo bromado ao que denominamos **aplyzanzine B**. Neste capítulo detállase o mecanismo de acción deste novo metabolito xunto ao **anomian B** descrito no capítulo anterior.

No **Capítulo IV** estudouse a esponxa *Theonella* sp. da cal illouse un novo composto natural, o **ácido lanesoico**, que presenta un esqueleto inusual de tetrahidropirimidina, combinado coa natureza de zwitteriónica da súa estrutura.

O **Capítulo V** recolle o illamento de novos análogos da familia dos **enigmazoles** a partir da esponxa da familia das Neopeltidae. Neste caso a utilización de diferentes derivatizacións químicas foi clave para a resolución da estereoquímica destes compostos con actividade citotóxica.

No **Capítulo VI** descríbese o illamento das **halioxepines A, B e C** a partir da esponxa Haliclona (Reniera) sp., sendo necesario recorrer a cálculos computacionais para relacionar os diferentes estereoclusters presentes nas tres moléculas.

Por último, no **Capítulo VII** descríbese o illamento dun novo péptido cíclico **gunungamide A** e de como se pode aplicar a análise configuracional baseado en constantes de acoplamento xunto co método avanzado de Marfey para facilitar a resolución da súa estereoquímica tanto relativa como absoluta dos aminoácidos presentes no esqueleto peptídico do composto. Esta nova metodoloxía combinada aplicouse tamén ao composto coñecido stellatolide A.

## Abstract

The dissertation presented below describes the examination of six sponges collected in Indonesia, and the identification of six new families of chemical compounds with cytotoxic activity. The most innovative part of this PhD thesis is the approach selected for the structural elucidation of the newly identified chemical entities, consisting in the combination of nuclear magnetic resonance techniques with density functional theory (DFT) based computational modelling.

**Chapter 1** introduces current perspectives regarding the use of natural products of marine origin for the development of pharmaceutical products, including ongoing industry developments in the different clinical markets.

The state of the art of the different methods and techniques used for the identification of the chemical structure of the isolated compounds is also presented, focusing on the study of relative and absolute stereochemistry. These techniques will be used in the subsequent chapters for the resolution of the three-dimensional structure of the newly described chemical compounds.

To facilitate the reading, the fractionation and isolation processes applied to all studied sponge extracts are presented in a schematic way.

**Chapter II** describes the study of the sponge *Hexadella* sp. and the isolation of a cytotoxic bromotyrosine derivative named **anomoian B**.

**Chapter III** presents the study of the *Jaspis* sp. and *Bubaris* sp. sponge association and the isolation of a new active brominated derivative named **aplyzanzine B**. The chapter also describes the mechanism of action of this new metabolite as well as of the previously described **anomoian B**.

**Chapter IV** describes the study of the sponge *Theonella* sp. and the isolation of a new natural compound, **lanesoic acid**, with an unusual tetrahydropyrimidin skeleton combined with the zwitterionic nature of its chemical structure.

**Chaper V** illustrates the isolation of new analogs of the **enigmazoles** family from the sponge belonging to the family Neopeltidae. Different chemical derivatization procedures were required for the stereochemical resolution of these compounds with cytotoxic activity.

**Chapter VI** describes the isolation of **halioxepines A, B and C** from the sponge *Haliclona (Reniera)* sp., and the computational modelling required for relating the different stereo-clusters present in the three molecules.

Finally, **Chapter VII** illustrates the isolation of a new cyclic peptide, **gunungamide A**, and the applicability of configurational analysis based on coupling constants in combination with the advanced Marfey's method, to facilitate the relative and absolute stereochemical resolution of the amino acids present in the peptidic skeleton of this compound. This new combined methodological approach was also applied to the compound **stellatolide A**.

## Tabla de contenido

OBJETIVOS .....	2
INTRODUCCIÓN .....	4
1. ANTECEDENTES DE COMPUESTOS CITOTÓXICAES DE ORIGEN MARINO .....	4
1.1 Fármacos de origen marino no antitumorales .....	7
1.1.1 Analgésicos .....	7
1.1.2 Antivirales .....	7
1.1.3 Tratamiento del colesterol .....	7
1.2 Fármacos de origen marino antitumorales .....	8
2. ESTUDIO DE LA CONFIGURACIÓN TRIDIMENSIONAL DE UN COMPUESTO ORGÁNICO .....	12
1.1. Uso de fragmentos sintéticos .....	17
1.2. Rotación óptica [ $\alpha_D$ ], dicroísmo circular (CD) y difracción de rayos X .....	17
1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear .....	18
2.3.1. Base de datos universal: Kishi.....	19
2.3.2. Asignación directa de la configuración relativa en sistemas 1,3- <i>n</i> -metilo .....	20
2.3.3. El método de Murata, JBCA .....	21
1.4. Derivatización química .....	27
2.4.1. Derivatización quiral de alcoholes secundarios y ácidos carboxílicos.....	27
2.4.2. Formación de acetónidos en sistemas 1,3-dioles.....	33
2.4.3. Determinación de la configuración absoluta de aminoácidos en compuestos peptídicos.....	34
1.5. Cálculos computacionales.....	37

3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL AISLAMIENTO DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA .....	41
2. ESTUDIO DE LA ESPONJA <i>HEXADELLA</i> SP CF INDICA.....	48
2.1. Precedentes de compuestos aislados de esponjas del género <i>Hexadella</i> .....	49
2.2. <i>Hexadella</i> sp. cf <i>Hexadella indica</i> .....	52
2.2.1 Identificación y clasificación.....	52
2.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	53
2.2.3 Determinación estructural.....	54
2.2.3.1. Anomian B (1) .....	54
2.2.3.2. Aplysamine 4 (2) .....	67
3. ESTUDIO DE LA ESPONJA <i>JASPIS</i> SP. Y <i>BUBARIS</i> SP. ....	76
3.1. Compuestos aislados con anterioridad del género <i>Jaspis</i> .....	77
3.2. Asociación <i>Jaspis</i> sp. cf <i>lutea</i> y <i>Bubaris</i> sp.....	80
3.2.1. Identificación y clasificación.....	80
3.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	81
3.2.3. Determinación estructural.....	82
3.2.3.1. Aplyzanzine B (3) .....	82
3.3. Estudio del mecanismo de acción de los compuestos derivados de bromotirosina.....	97
3.3.1. Inhibición de las histonas deacetilasas (HDAC) .....	97
3.3.2. Inducción de apoptosis a través de la ruta de las caspasas .	99
3.3.2.1. HT-29 (colon) .....	102
3.3.2.2. MDA-MB-231 (mama) .....	104
3.3.2.3. A-549 (pulmón) .....	104



4. ESTUDIO DE LA ESPONJA <i>THEONELLA</i> SP.....	108
4.1.    Compuestos aislados.....	109
4.2. <i>Theonella</i> sp. cf <i>swinhoei</i> .....	111
4.2.1 Identificación y clasificación.....	111
4.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	112
4.2.3. Determinación estructural.....	115
4.2.3.1. Cupolamida A (4) .....	115
4.2.3.2. Kumusina/trachycladina A (5) .....	121
4.2.3.3. Ácido lanesoico (6) .....	123
5. ESTUDIO DE LA ESPONJA NEOPELTIDAE .....	142
5.1.    Compuestos aislados con anterioridad .....	143
5.2.    Neopeltidae .....	145
5.2.1 Identificación y clasificación.....	145
5.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	145
5.2.3. Determinación estructural.....	146
5.2.3.1. Enigmazol C (7) .....	146
5.2.3.2. Producto de degradación de enigmazol C (7) durante la purificación, compuesto 8.....	157
5.2.3.3. Enigmazol D (9) .....	160
5.2.3.4. Determinación de la estereoquímica de Enigmazol C (7) .....	164
a) Estereoquímica absoluta de C5.....	164
b) Determinación de la estereoquímica absoluta de C17. ....	166
c) Determinación de la estereoquímica del doble enlace $\Delta^{21}$ .....	167
d) Determinación de la estereoquímica de C11 y C13.....	167
e) Determinación de la estereoquímica de C23 .....	173
f) Estereoquímica final del compuesto 7. ....	173

6. ESTUDIO DE LA ESPONJA <i>HALICLONA (RENIERA)</i> SP.....	178
6.1.    Compuestos aislados con anterioridad .....	179
6.2. <i>Haliclona (Reniera)</i> sp.....	180
6.2.1 Identificación y clasificación.....	180
6.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	181
6.2.3. Determinación estructural .....	183
6.2.3.1. Halioxepina (10).....	183
6.2.3.2. Halioxepine B (11) .....	189
6.2.3.3. Halioxepina C (12) .....	202
6.2.4. Determinación de la estereoquímica relativa de la halioxepina y halioxepina B, y estereoquímica absoluta de la halioxepina C.....	205
6.2.4.1. Esterequímica relativa de Halioxepine B .....	205
6.2.4.2. Esterequímica relativa de Halioxepine (10).....	208
6.2.4.3. Esterequímica absoluta de Halioxepine C (11) .....	209
7. ESTUDIO DE LA ESPONJA <i>DISCODERMIA</i> SP. ....	214
7.1.    Compuestos más significativos aislados del genero <i>Discodermia</i> .....	215
7.2.    Discodermia sp. ....	217
7.2.1. Identificación y clasificación.....	217
7.2.2. Extracción y fraccionamiento .....	218
7.2.3. Determinación estructural .....	219
7.2.3.1. Aurantoside E (13).....	219
7.2.3.2. Gunungamida A (14).....	222
7.2.4. Determinación de la estereoquímica absoluta de 14 .....	232
7.2.5. Aplicación de la combinación JBCA y Marfey a stellatolido A .....	241

CONCLUSIONES.....	246
PARTE EXPERIMENTAL.....	254
TRABAJOS Y COMUNICACIONES PESENTADAS EN CONGRESOS Y PUBLICADAS EN REVISTAS CIENTÍFICAS.....	279



**ABREVIATURAS:**

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** Rotación óptica específica

**1D:** monodimensional

**<sup>1</sup>H-RMN:** RMN de Hidrógeno

**<sup>13</sup>C-RMN:** RMN de Carbono

**2D:** bidimensional

**AF:** Ácido Fórmico

**CD:** Dicroísmo circular

**COSY:** COrrrelation SpectroscopY

**$\delta$ :** Desplazamiento químico en ppm

**d:** doblete

**dd:** doble doblete

**ddd:** doble doble doblete

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** DiCloroMetano

**DFT:** Density Functional Theory

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**ESI:** ElectroSpray Ionization

**FDA:** Amida 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-alanina

**g:** gramo

**GI<sub>50</sub>:** Growth Inhibition 50%

**HSQC-HECADE:** Heteronuclear Couplings from ASSCI-domain experiments with E.COSY

**HMBC:** Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**HRMS:** High Resolution Mass Spectrometry

**HRESIMS:** High Resolution ElectroSpray Mass Spectrometry

**HSQC:** Heteronuclear Single Quantum Correlation

**IC<sub>50</sub>:** Inhibitory Concentration 50%

**IR:** Infra-Rojo

**J:** Constante de acoplamiento

**JBCA:** J-Based Configuration Analysis

**J-HMBC:** J-resolved Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**L:** large

**LC<sub>50</sub>:** Lethal Dose 50%

**LR-HSQMBC:** Long Range Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation

**m:** multiplete

**MeOH:** Metanol

**mg:** miligramo

**MHz:** Megahercio

**min:** minuto

**mL:** mililitro

**MS:** Mass Spectrometry

**MTPA:** ácido metoxitri fluorometilfenilacético

**m/z:** Relación masa carga

**NOESY:** Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**ROE:** Rotating-frame Overhauser Effect

**ROESY:** Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

**RP:** Reverse Phase

**s:** singlete

**S:** small

**t:** triplet

**T:** temperatura

**t<sub>R</sub>:** tiempo de retención

**TFA:** TriFluoro Acetic acid

**TGI:** Total Growth Inhibition

**TOCSY:** TOtal Correlation Spectroscopy

**TOF:** Time Of Flight

**UV:** UltraViolet

**VLC:** Vacuum Liquid Chromatography

## *OBJETIVOS*

### OBJETIVOS

Hoy en día, el cáncer supone una de las principales enfermedades causantes de muertes que afectan al ser humano. El tratamiento de esta enfermedad no es nada sencillo, siendo la quimioterapia, una de las medidas actuales más eficaces. Con el fin de encontrar nuevas moléculas que faciliten el desarrollo de nuevos tratamientos, muchos grupos de investigación han buscado con éxito en la naturaleza una fuente de inspiración. Es por ello, que basándose en el hecho de que mares y océanos representan el 70% de la superficie terrestre, este trabajo de investigación se centra en el estudio de macroorganismos de origen marino, con los siguientes objetivos:

- Selección de organismos marinos potencialmente productores de nuevas entidades químicas.
- Aislamiento de aquellos compuestos que presenten actividad citotóxica *in vitro*.
- Elucidación de la estructura plana de los compuestos aislados.
- Determinación de la estructura tridimensional de dichos metabolitos mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y cálculos computacionales.
- Evaluación de la citotoxicidad de todos aquellos compuestos activos en un panel de células tumorales.



*CAPÍTULO I*  
*INTRODUCCIÓN*

### INTRODUCCIÓN

#### 1. ANTECEDENTES DE COMPUESTOS CITOTÓXICAES DE ORIGEN MARINO

La naturaleza nos ha provisto de un amplio y diverso repertorio de “remedios”, indispensables para el tratamiento de muchas enfermedades.<sup>1</sup> Las plantas terrestres, utilizadas para el estudio de principios activos, fueron las primeras fuentes naturales como posibles fármacos. Como consecuencia se aislaron y desarrollaron nuevos fármacos de origen natural, hasta la llegada de los antibióticos como la penicilina en 1928. En la actualidad, las plantas continúan siendo una fuente importante de aislamiento de nuevas estructuras para el desarrollo de nuevos fármacos, pero durante las últimas décadas se han incorporado otras alternativas como los productos naturales de origen marino.

Pese a contar con más de un 70% de la superficie terrestre, los mares y los océanos llamaron la atención mucho más tarde. Los primeros productos naturales extraídos de un organismo marino que fueron desarrollados para nuevos tratamientos fueron los nucleósidos espongouridina y espongothimidina (Figura 1), que aislados de la esponja *Cryptotethya cripta* (Bergmann y Feeney en 1951),<sup>1</sup> sirvieron como cabeza de serie para el desarrollo de los antivirales derivados de la Ara-A. Sin embargo, el descubrimiento de las prostaglandinas en la gorgonia *Plexaura homomalla* (Weinheimer y Spraggins en 1969)<sup>2</sup> en el Caribe se considera como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos de origen marino,<sup>3</sup> al mismo tiempo que se descubría que estos compuestos eran importantes mediadores en el cuerpo humano en procesos de inflamación.

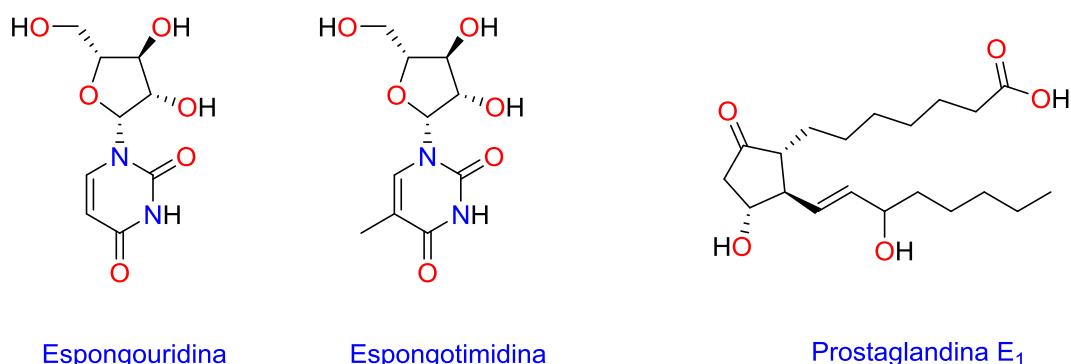
---

<sup>1</sup> Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981–987.

<sup>2</sup> Weinheimer, A. J.; Spraggins, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 5185–5188.

<sup>3</sup> Proksch, P.; Ebel, R.; Edrada, R.A.; Wray, V.; Steube, K. *Bioactive Natural Products from Marine Invertebrates and Associated Fungi. Muller, W.E.G., Sponges (Porifera)* **2003**, 117-142.

No fue hasta el desarrollo de nuevas técnicas de buceo y, sobre todo, los grandes avances en las técnicas espectroscópicas y espectrométricas, cuando se pudo estandarizar el estudio de los metabolitos secundarios de origen marino. Sus estructuras complejas, con esqueletos carbonados totalmente novedosos, han estimulado la búsqueda de nuevos compuestos de origen marino para que puedan ser utilizados como fármacos.



**Figura 1.** Estructuras del comienzo del estudio de organismos marinos.

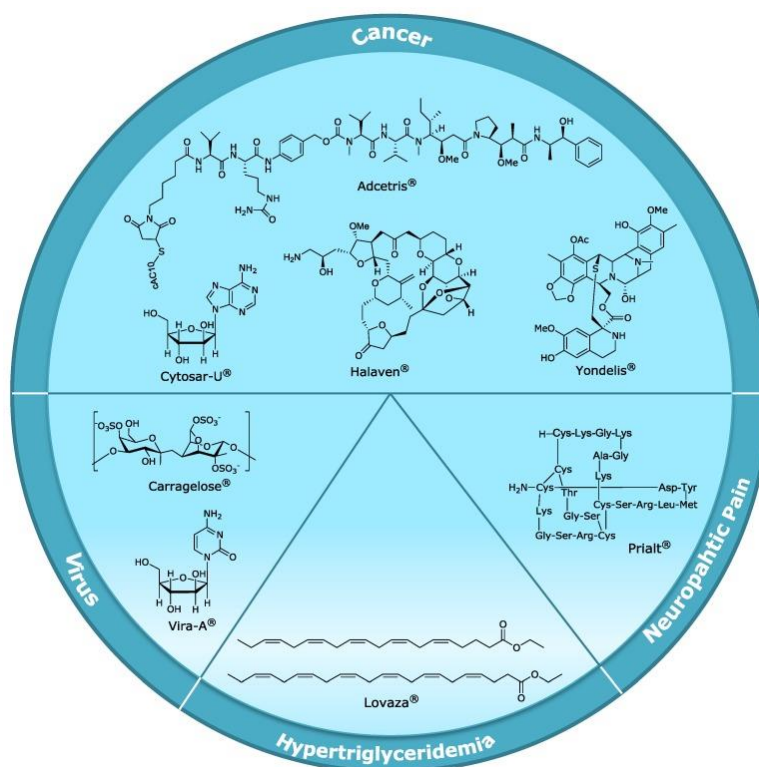
Desde los años 60, el estudio de compuestos aislados de organismos de origen marino ha ido ganando en importancia y actualmente se conocen casi 30000 estructuras según la base de datos MarinLit.<sup>4</sup> La principal fuente de productos naturales marinos han sido los invertebrados, en donde las esponjas son los más prolíferos en sus estudios, seguidos por los tunicados y moluscos,<sup>5</sup> aunque durante los últimos años el número de metabolitos relacionados con microorganismos ha ido en aumento, convirtiéndose en la principal fuente de nuevos compuestos.<sup>6</sup>

<sup>4</sup> <http://www.pub.rsc.org/marinlit/>. Última fecha de acceso 22-02-2017

<sup>5</sup> Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 1–49.

<sup>6</sup> Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, 34, 235–294.

Entre los años 1981 y 2014, se han aprobado 1355 nuevos fármacos, de los cuales el porcentaje de derivados de productos naturales ha ido en aumento. Si se toman sólo los últimos 10 años, el 36,5% corresponde a derivados de productos naturales,<sup>7</sup> siendo las áreas de aplicación más investigadas las de las enfermedades infecciosas, cáncer, hipertensión e inflamación.<sup>8</sup> Sin embargo, el número de fármacos aislados o derivados de organismos marinos aprobados, es muy reducido. De hecho, de los 8 compuestos que actualmente están en el mercado (Figura 2), sólo tres (Prialt®, Yondelis® y Carragelose®) son fármacos sin ninguna modificación de la molécula natural original.<sup>9</sup>



**Figura 2.** Estructuras químicas de fármacos de origen marino en el mercado. Fuente: Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 1066–1101.

<sup>7</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.

<sup>8</sup> Jiménez, C. *An. Química* **2013**, *109*, 134–141.

<sup>9</sup> Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 1066–1101.

## **1.1 Fármacos de origen marino no antitumorales**

### **1.1.1 Analgésicos**

El primer fármaco aprobado procedente de un organismo marino fue ziconotide,<sup>10</sup> un péptido procedente de un caracol tropical, y fue aprobado por la FDA en diciembre de 2004 y en Europa en febrero de 2005 bajo el nombre de Prialt® para el tratamiento del dolor crónico de la espina dorsal.

### **1.1.2 Antivirales**

El antiviral vidarabina (Vira-A®) es utilizado para el tratamiento de herpes, poxvirus y algunos rhabdovirus, hepadnavirus y virus-ARN tumorales. Desgraciadamente es más tóxico y menos estable metabólicamente que otros antivirales. Actualmente se obtiene del *Streptomyces antibioticus*, pero en 2001 fue retirado del mercado en América por su restrictiva ventana terapéutica. En Europa aún se utiliza para aplicaciones oftalmológicas.

Por otro lado, los carragenatos (Carragelose®) son una familia de polisacáridos sulfatados lineales extraídos del alga roja del género *Rhodophyceae*. La empresa Marinomed Biotechnologie GmbH, ha desarrollado este producto en forma de aerosol nasal para el tratamiento de resfriados comunes.<sup>11</sup>

### **1.1.3 Tratamiento del colesterol**

Lovaza®, un derivado de aceites de pescado, es el nombre comercial del compuesto desarrollado por Reliant Pharmaceutical para el tratamiento del colesterol.<sup>12</sup> Comercializado por GlaxoSmithKline contiene una combinación de ésteres etílicos del ácido eicopentaenóico y docohexaenóico.

---

<sup>10</sup> McIntosh, M.; Cruz, L. J.; Hunkapiller, M. W.; Gray, W. R.; Olivera, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 218, 329–334.

<sup>11</sup> Eccles, R.; Meier, C.; Jawad, M.; Weinmüller, R.; Grassauer, A.; Prieschl-Grassauer, E. *Respir. Res.* **2010**, 11, 108-118.

<sup>12</sup> Glueck, C. J.; Khan, N.; Riaz, M.; Padda, J.; Khan, Z.; Wang, P. *Lipids Health Dis.* **2012**, 11, 143-152.

### 1.2 Fármacos de origen marino antitumorales

La presencia de una unidad de arabinosa en lugar de una de ribosa en los nucleósidos esponguridina y espongotimidina, inspiraron la síntesis de análogos ara-nucleósidos, conduciendo al desarrollo del fármaco cytarabine en 1969 como antitumoral y vidarabina en 1976 como antiviral. Aunque la cytarabine fue sintetizada en 1959 y posteriormente producida por fermentación del *Streptomyces griseus*, el análogo natural de la citarabina se aisló más tarde de la gorgonia *Eunicella cavolini*.<sup>13</sup> La citarabina continúa siendo la primera elección para el tratamiento de la leucemia mieloide, linfoma no-Hodgkin y leucemia meníngea.

Sin embargo, el primer principio activo de origen marino empleado en tratamiento de quimioterapia fue ecteinascidin-743/ET743 (Yondelis®), compuesto procedente del tunicado *Ectenascidia turbinata*, que fue desarrollado por la empresa PharmaMar S.A. y aprobado en la Unión Europea en el año 2007 para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y en 2009 contra el cáncer de ovario recurrente. Recientemente, en el año 2015, ha sido aprobado en Estados Unidos y Japón.

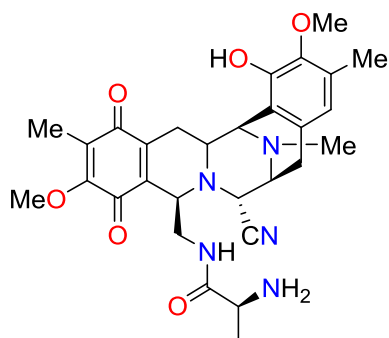
Para su suministro, el tunicado se cultivó inicialmente con el fin de disponer de la suficiente cantidad de metabolito para llevar a cabo tanto los estudios preclínicos y clínicos. En 1996 Corey y su grupo consiguieron desarrollar una síntesis total, aunque esta se consideró no viable para su desarrollo industrial. En la actualidad el suministro se asegura de una manera económicamente viable mediante una ruta semisintética desarrollada por PharmaMar.<sup>14</sup>

---

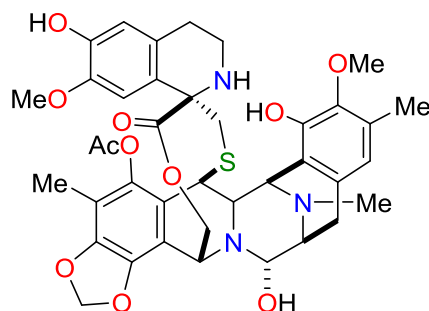
<sup>13</sup> Cimino, G.; Derosa, S.; Destefano, S. *Experientia* **1984**, 40, 339–340.

<sup>14</sup> Cuevas, C.; Francesch, A. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 322–337.

Este proceso sintético parte del uso de la cianosafracina B, un antibiótico obtenido de la fermentación inducida con cianuro de *Pseudomonas fluorescens*, seguido de una transformación sintética con 20 etapas.



Cianosafracin B



ET-743

Otro fármaco de origen marino es el mesilato de eribulina (Halaven<sup>®</sup>) que fue aprobado en 2010 para el tratamiento del cáncer de mama metastático. El fármaco desarrollado por Eisai, es un análogo del macrociclo aislado en 1986 halichondrin B.<sup>15</sup>

El último fármaco de origen marino que ha sido aprobado por las autoridades competentes, ha sido brentuximab vedotin 63 (Adcetris<sup>®</sup>), desarrollado para el tratamiento del linfoma de Hodgkin. Es un análogo sintético de la dolastatina 10 que está conjugado al anticuerpo anti-CD30. El principio activo dolastatina 10 fue aislado en 1972 de la liebre de mar *Dolabella auricularia*, pero hasta 1987 no se conoció su estructura.<sup>16</sup> Para ello, se necesitó recoger 1 tonelada de biomasa para conseguir solo 29 mg de compuesto. El desarrollo de anticuerpos conjugados (ADCs) de actuación selectiva en las células tumorales, ha conseguido una alta efectividad y una buena tolerancia, lo que aceleró la aprobación de este fármaco por la FDA.

<sup>15</sup> Hirata, Y.; Uemura, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.

<sup>16</sup> Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885.

Aunque aún son pocos los fármacos aprobados desarrollados a partir de productos naturales de origen marino (Tabla 1), cada vez se están desarrollando más estudios clínicos para el tratamiento de más enfermedades, especialmente contra el cáncer. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de nuevos compuestos de origen marino que están en fase de desarrollo para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

**Tabla 1.** Fármacos de origen marino aprobados en el mercado.

Principio activo (Nombre comercial)	Origen	Fuente natural <u>Organismo</u>	Empresa farmaceutica	Área terapéutica
Cytarabine (Cytosar <sup>®</sup> , Depocyt <sup>®</sup> )	Derivado de producto natural (Spongothymidine)	Esponja <i>Cryptotethya crypta</i>	Bedford Enzon	Cancer
Vidarabine (Vira-A <sup>®</sup> )	Derivado de producto natural (Spongouridine)	Esponja <i>Cryptotethya crypta</i>	King Pharma	Antiviral
Ω-Conotoxin Ziconotide (Priol <sup>®</sup> )	Producto natural	Caracol marino <i>Conus magus</i>	Elan Corporation	Dolor neuropático
Ácido Omega-3 etil ester (Lovaza <sup>®</sup> )	Derivado de producto natural (Ácido graso Omega-3)	Pescado	GlaxoSmithKline	Hipertrigliceridemia
Ecteinascidin 743Trabectedin (Yondelis <sup>®</sup> )	Producto natural	Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i>	PharmaMar	Cancer
Eribulin mesilato (Halaven <sup>®</sup> )	Derivado de producto natural Halichondrin B	Esponja <i>Halichondria okadai</i>	Eisai	Cancer
Brentuximab vedotin (Adcetris <sup>®</sup> )	Derivado de producto natural Dolastatin 10	Liebre de mar <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetics	Cancer
Iota-carrageenan (Carragelose <sup>®</sup> )	Producto natural	Alga roja <i>Eucheuma Cnodus</i>	Marinomed Boehringer Ingelheim	Antiviral



Tabla 2. Fármacos de origen marino en fase de desarrollo.

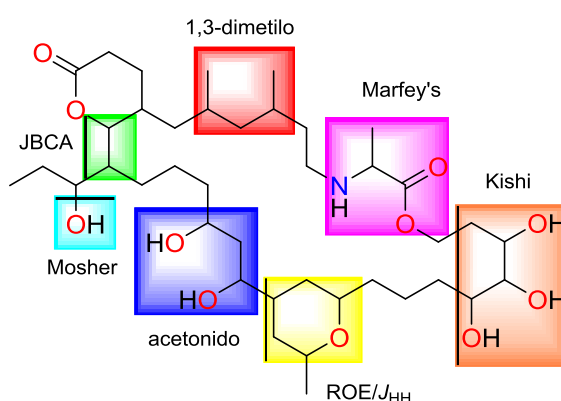
Principio activo (Nombre comercial)	Origen	Fuente natural <u>Organismo</u>	Empresa farmaceutica	Area terapéutica	Estado actual
Pliditepsin (Aplidin®)	Producto natural	Ascidia <i>Aplidium albicans</i>	PharmaMar	Cancer	Fase III
Lurbinectedin (PM01183)	Derivado de producto natural	Ecteinascidins Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i>	PharmaMar	Cancer	Fase III
CDX-011	Derivado de producto natural (Dolastatin 10)	Liebre de mar <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetics	Cancer	Fase II
PM060184	Producto natural	Esponja <i>Lithoplocamia lithistoides</i>	PharmaMar	Cancer	Fase II
Salinosporamide (Marizomib)	Producto natural	Actinomiceto marino <i>Salinospora tropica</i>	Nereus Pharmaceutical	Cancer	Fase I
ASG-5ME	Derivado de producto natural (Dolastatin 10)	Liebre de mar <i>Dolabella auricularia</i>	Astellas	Cancer	Fase I

## 2. ESTUDIO DE LA CONFIGURACIÓN TRIDIMENSIONAL DE UN COMPUESTO ORGÁNICO

En el proceso de elucidación estructural de un nuevo compuesto orgánico, la determinación de la estereoquímica es un paso fundamental. La estructura de un compuesto plano no tiene una configuración tridimensional que haya que determinar, pero cuando se tiene una estructura que posee carbonos asimétricos, es necesario discernir entre las  $2^n$  ( $n = n^{\circ}$  carbonos quirales) moléculas diastereoisómeras con distinta disposición espacial.

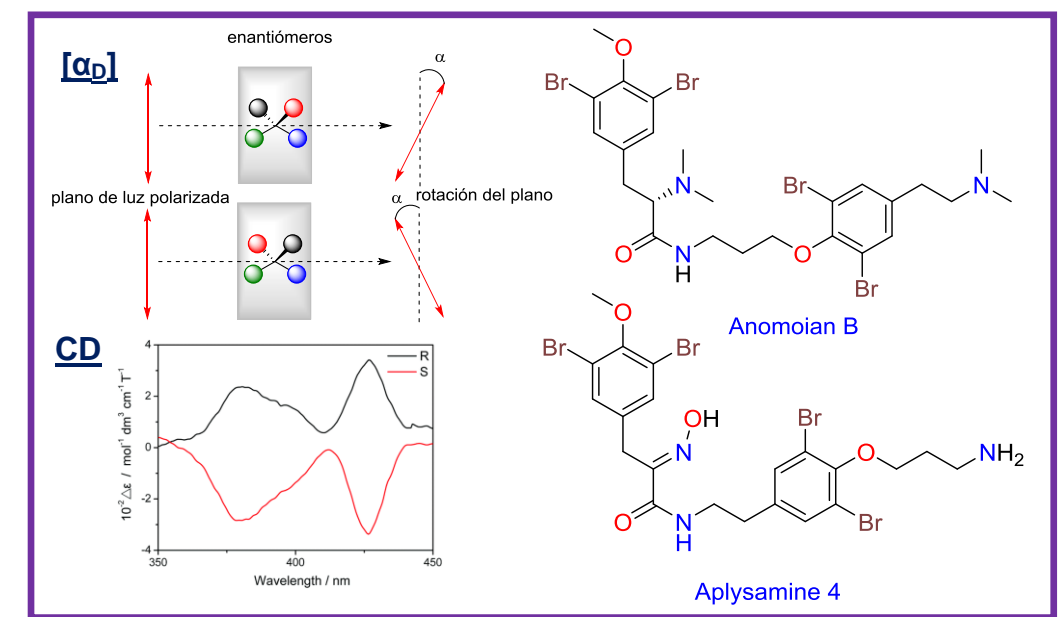
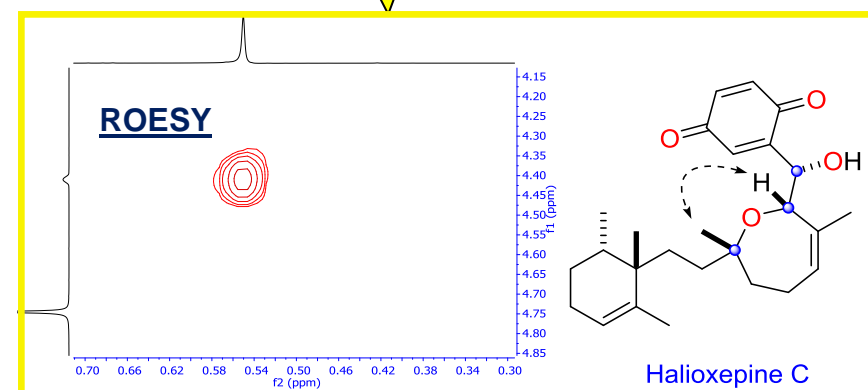
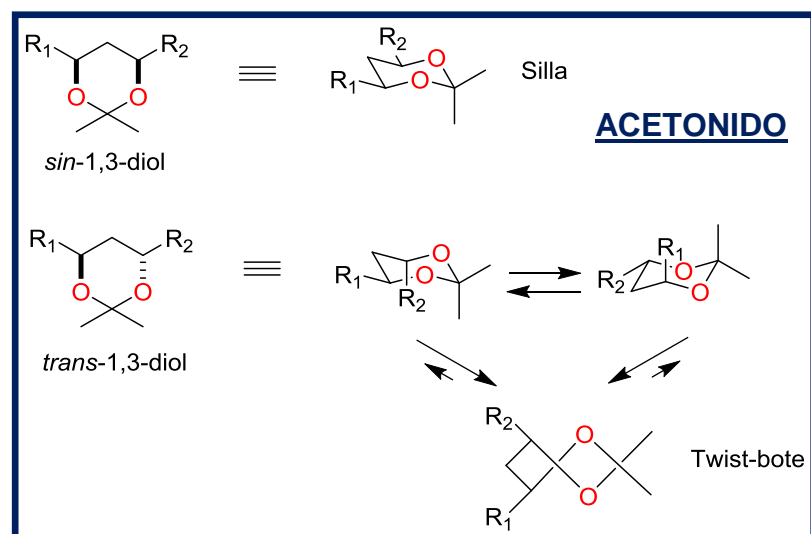
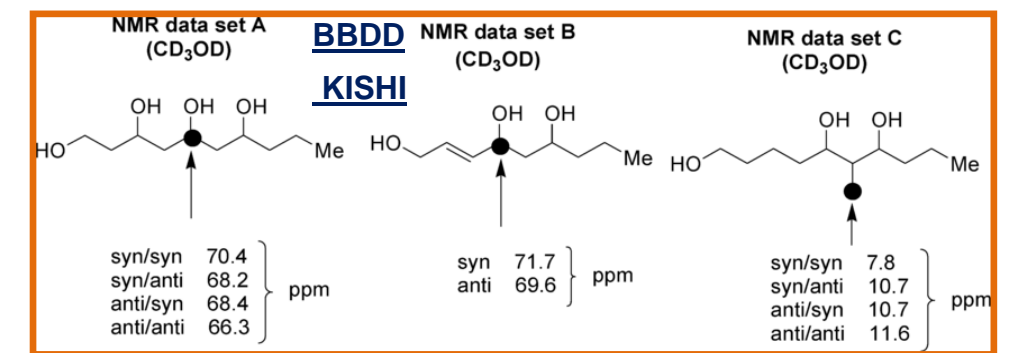
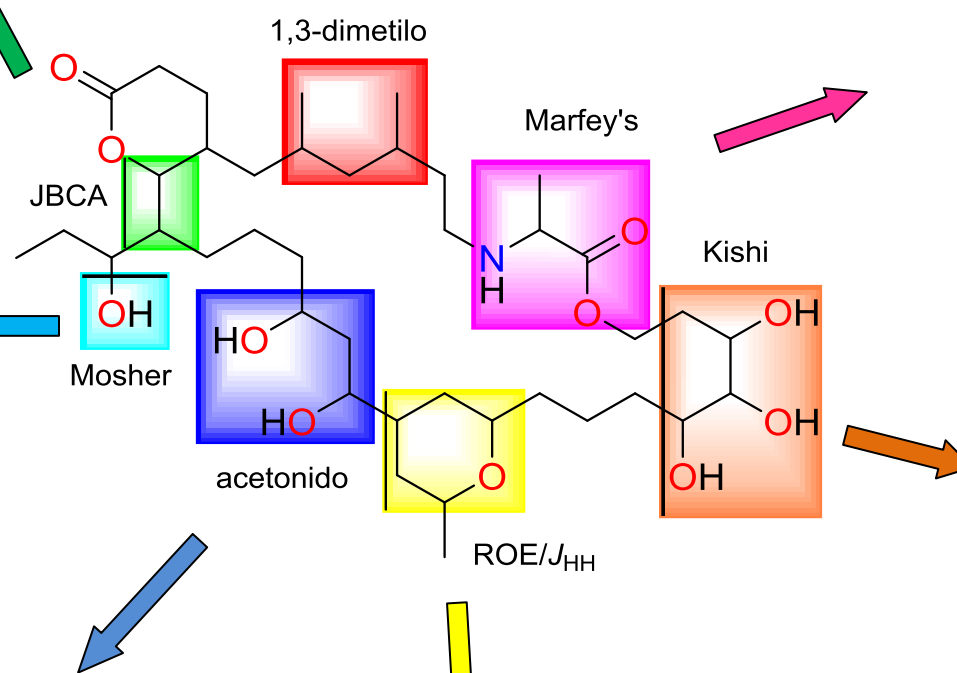
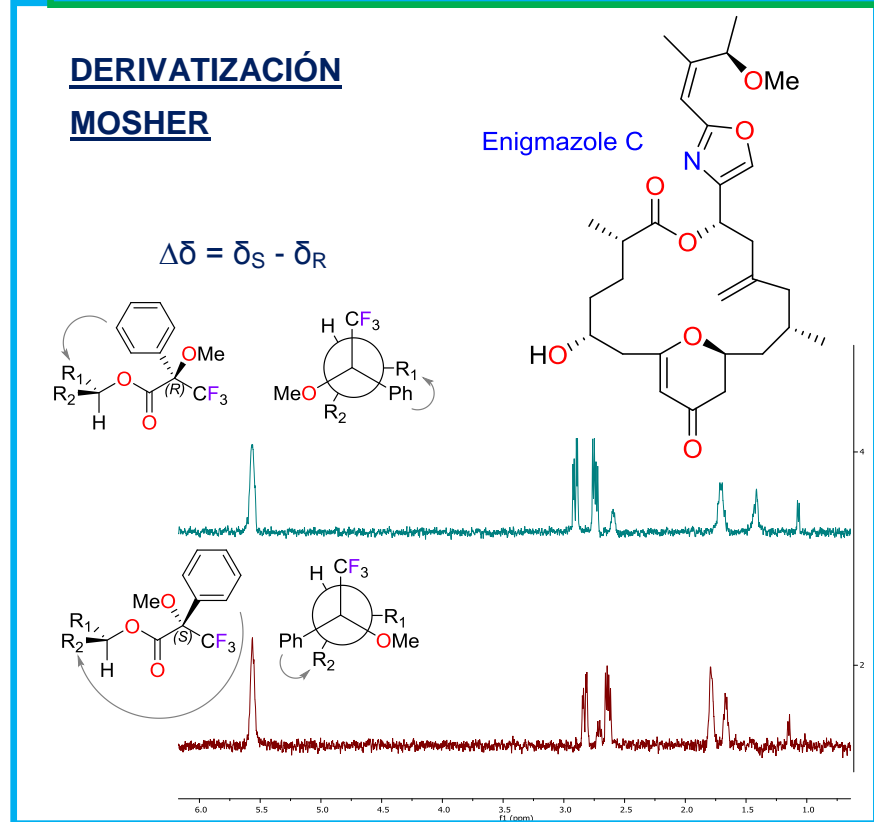
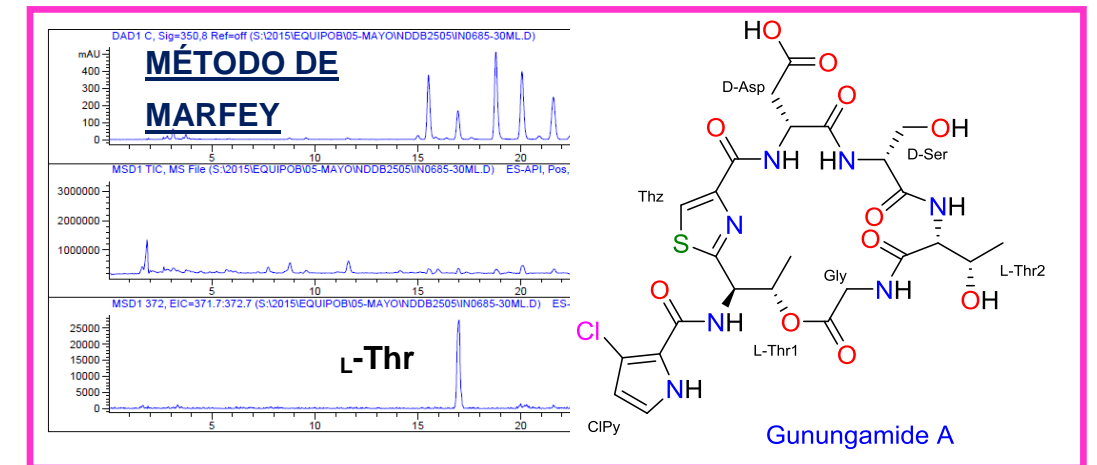
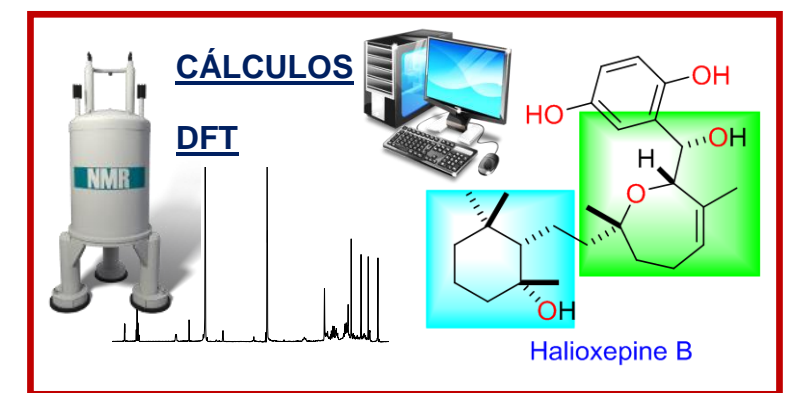
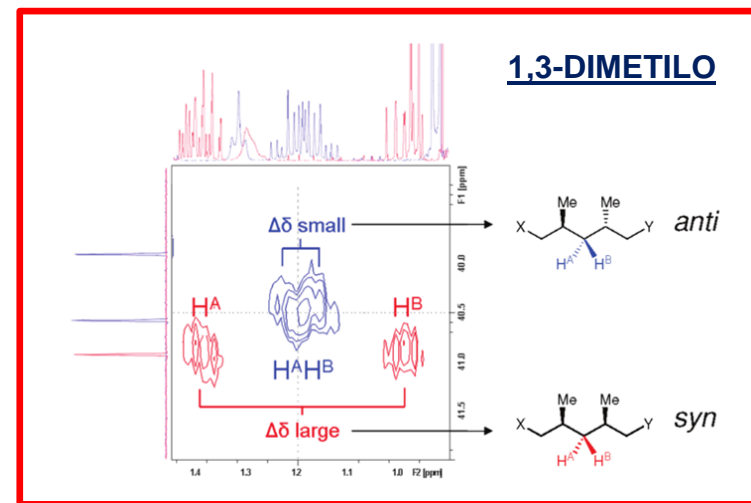
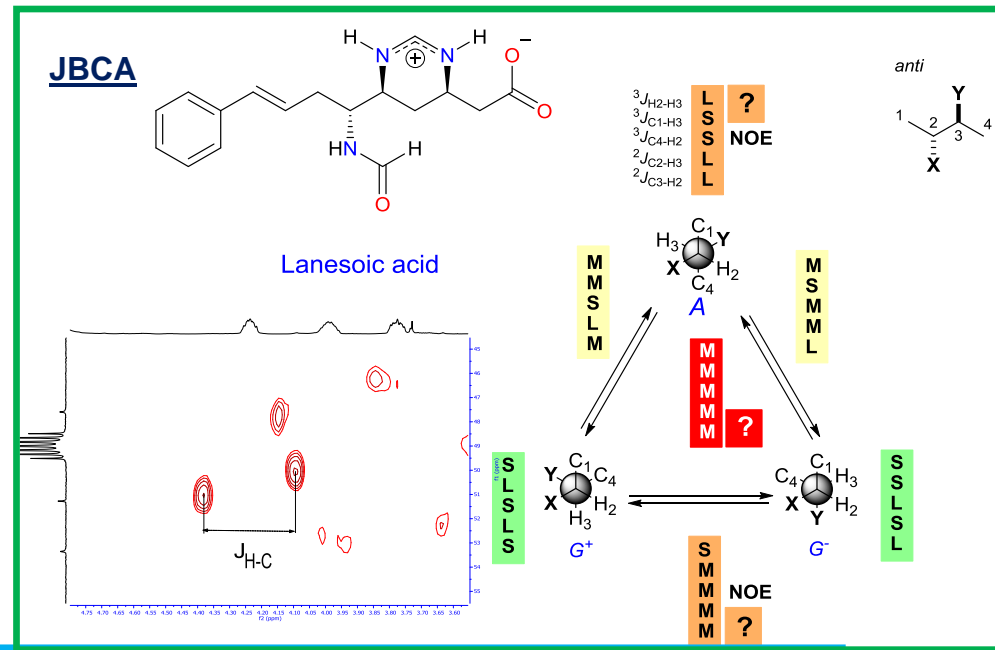
La resolución de la configuración relativa o absoluta en compuestos naturales, puede convertirse en una tarea más difícil que el estudio de la secuenciación de los átomos que los conforman. Especialmente compleja es el caso de aquellos centros quirales que se encuentran en cadenas acíclicas con gran libertad conformacional. El uso de técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear, y en especial la utilización de experimentos homonucleares ROESY y NOESY ó a través del estudio de las constantes de acoplamiento  $^2,3J$  homo (H-H) y heteronucleares (C-H), supone una gran ayuda a la hora de abordar la estereoquímica relativa de un compuesto. Otra ayuda muy importante es al derivatización química de determinados grupos funcionales, la observación de otras propiedades físicas complementarias como el poder rotatorio o el dicroísmo circular, que permite determinar en algunos casos la estereoquímica absoluta de los compuestos estudiados.

En los últimos diez años, el uso de cálculos computacionales basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT) ha permitido dar un paso de gigante a la hora de determinar las disposiciones espaciales de muchos centros asimétricos, especialmente en aquellos casos en el que no se puede recurrir a métodos experimentales. Algunas de estas técnicas utilizadas en la actualidad para la determinación geométrica de compuestos orgánicos (Figura 3), se introducen de forma básica a continuación ya que se utilizan en los capítulos posteriores.



**Figura 3.** Ejemplos de técnicas utilizadas para la determinación de la estereoquímica.

# REPRESENTACIÓN DE LAS PRINCIPALES TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS/CROMATOGRÁFICAS PARA LA RESOLUCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN RELATIVA Y ABSOLUTA EN COMPUESTOS PUROS.



METODOLOGIA	DESCRIPCION	APLICACION	BIBLIOGRAFÍA
Modelos sintéticos	La síntesis de aquellos fragmentos que poseen centros irresolubles mediante otras técnicas, puede ayudar en la determinación de la configuración absoluta. La comparación de sus desplazamientos, $[\alpha]_D$ ó CD, son algunos de los métodos utilizados con estos fragmentos.	Péptidos con aminoácidos no naturales, fragmentos con centros quirales aislados, cadenas con libertad de giro, etc.	
Rotación óptica	Debido a la propiedad física de dos enantiómeros de desviar la luz con el mismo valor absoluto pero con signo contrario, es relativamente sencillo diferenciarlos mediante esta técnica.	Diferenciación de parejas de enantiómeros, relacionar estereoquímica de compuestos con esqueletos similares.	
Dicroísmo circular	Al igual que ocurre con la rotación óptica, el dicroísmo circular de dos enantiómeros se representa mediante curvas idénticas pero de diferente signo.	Diferenciar parejas de enantiómeros, relacionar con curvas de dicroísmo circular teóricas obtenidas mediante cálculos computacionales.	
Rayos X	La difracción de rayos X permite conocer la configuración absoluta de todos los centros asimétricos de la molécula, siempre que se consiga cristalizar y coordinar con un átomo pesado.	Este proceso está muy limitado por la necesidad de obtener sólidos cristalinos, especialmente en el ámbito de los productos naturales donde las cantidades suelen ser muy reducidas.	
Comparación bibliográfica de RMN	Entre los años 1999 y 2002, Kishi y col. desarrollaron un nuevo procedimiento para la determinación la configuración geométrica de nuevos compuestos aislados, a partir de fragmentos estructurales de compuestos de configuración conocida.	Mediante comparación de los desplazamientos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del producto de configuración desconocida, frente a los desplazamientos de los diferentes isómeros de los modelos descritos, se puede determinar la configuración relativa o absoluta del compuesto sometido a estudio.	Lee, J.; Kobayashi, Y.; Tezuka, K.; Kishi, Y. <i>Org. Lett.</i> <b>1999</b> , <i>1</i> , 2181–2184.
Asignación directa 1,3- <i>n</i> -metilo	En sistemas 1,3- <i>n</i> -metilo, los entornos de los protones del metileno en sistemas con configuración <i>syn</i> serían diastereotópicos, mientras que en sistemas <i>anti</i> , donde los protones metilénicos tienen entornos similares, la diferencia del desplazamiento sería menor.	Este estudio puede llevarse a cabo en sistemas 1,3- <i>n</i> -metilo.	Schmidt, Y.; Breit, B. <i>Org. Lett.</i> <b>2010</b> , <i>12</i> , 2218–2221.
JBCA	Este método se basa en el estudio de los diferentes rotámeros entre dos centros adyacentes, a través de la comparación de las valores experimentales de $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ y $^3J_{\text{H,H}}$ .	El estudio de la configuración relativa a través del método JBCA (análisis configuracional basado en <i>J</i> s) permite la resolución de sistemas 1,2 o 1,3 mono o disustituidos por heteroátomos.	Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. <i>J. Org. Chem.</i> <b>1999</b> , <i>64</i> , 866–876.
Mosher	Se derivatiza el compuesto de forma separada con los dos enantiómeros del reactivo quiral (AMAAs), para obtener los dos derivados diastereoisómeros. La comparación de ambos espectros $^1\text{H}$ de RMN permite localizar ambos ligandos en el espacio alrededor del carbono asimétrico, y conocer así la configuración absoluta.	Esta metodología permite determinar la configuración absoluta de algunos centros quirales de la molécula que contengan determinados tipos de alcoholes y aminas.	Louzao, I.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. <i>Chem. Commun. (Camb)</i> . <b>2010</b> , <i>46</i> , 7903–7905.  Seco, J.M., Quiñoá, E.; Riguera, R. <i>Chem. Rev.</i> <b>2004</b> , <i>104</i> , 17–117.
PGME	Al igual que con los derivados de AMAAs, el reactivo fenilglicine metil éster (PGME), permite de modo similar, la elucidación de la configuración absoluta de algunos centros quirales. ácidos acéticos $\alpha,\alpha$ -disustituidos, como $\alpha$ -hidroxi, $\alpha$ -alcoxi y $\alpha$ -aciloxi- $\alpha$ , $\alpha$ -disustituidos ácidos acéticos, o ácidos propiónicos $\beta,\beta$ -disustituidos.	Ácidos acéticos $\alpha,\alpha$ -disustituidos, como $\alpha$ -hidroxi, $\alpha$ -alcoxi y $\alpha$ -aciloxi- $\alpha$ , $\alpha$ -disustituidos ácidos acéticos, o ácidos propiónicos $\beta,\beta$ -disustituidos.	Yabuuchi, T.; Kusumi, T. <i>J. Org. Chem.</i> <b>2000</b> , <i>65</i> , 397–404.

Acetonidos	Los desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}$ obtenidos mediante RMN de los metilos resultantes de formar un acetónido en el sistema 1,3-diol, permiten diferenciar sistemas <i>sin</i> y <i>anti</i> . En general, los acetónidos formados a partir de sistemas <i>sin</i> -1,3-diol tienen desplazamiento de $^{13}\text{C}$ para los metilos de 19 y 30 ppm, y para el carbono acetal 98.5 ppm. Por otro lado, los acetónidos obtenidos a partir de sistemas <i>trans</i> -1,3-diol, tienen ambos metilos con un desplazamiento de 25 ppm y el acetal un desplazamiento de 100.5 ppm.	Sistemas 1,3-dioles.	Rychnovsky, S. D.; Rogers, J. B.; Yang, G. J. <i>Org. Chem.</i> <b>1993</b> , 58, 3511–3515.
Marfey's	Al hacer reaccionar el reactivo de Marfey con la pareja de aminoácidos enantioméricos, se forman sus respectivos diastereoisómeros, que son fácilmente separables mediante HPLC sin necesidad del uso de columnas quirales. La comparación de sus tiempos de retención con los aminoácidos problema hidrolizados y derivatizados, permite la resolución de su estereoquímica absoluta.	Péptidos y compuestos con aminoácidos quirales en su estructura.	Marfey, P. <i>Carlsberg Res. Commun.</i> <b>1984</b> , 49, 591–596.
Cálculos computacionales	Las técnicas desarrolladas en la química computacional durante los últimos años, nos permiten calcular propiedades espectroscópicas teóricas para compararlas con los datos obtenidos en el laboratorio: RMN, CD, Raman, etc.	Moléculas con varios centros quirales.	Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. <i>Nat. Protoc.</i> <b>2014</b> , 9, 643–660.

### 1.1. Uso de fragmentos sintéticos

La determinación de la configuración de la estereoquímica de una molécula de origen natural, puede resolverse mediante la síntesis total de aquellos esteroisómeros que no hayan podido descartarse mediante la utilización de otras técnicas. Una vez obtenidos todos ellos, la comparación de sus desplazamientos de RMN, curvas de dicroísmo circular, etc. permite conocer la configuración absoluta total de la molécula. En ciertas ocasiones, la realización de síntesis completas supone un reto largo y tedioso, incluso en algunos casos inalcanzables. Por todo eso, la realización de síntesis parciales, o la realización de búsquedas de bibliográficas de compuestos con fragmentos similares, puede ser muy útil a la hora de abordar la resolución de la estereoquímica de alguno de los compuestos más complejos.

### 1.2. Rotación óptica $\alpha_D$ , dicroísmo circular (CD) y difracción de rayos X

Tanto la rotación óptica específica  $[\alpha_D]$ , como el dicroísmo circular, son dos técnicas que pueden ayudar a resolver la configuración absoluta de un compuesto. En el caso más sencillo, dos enantiómeros tendrán valores idénticos de rotación óptica específica, pero de signo contrario (Figura 4 a). Del mismo modo, dos enantiómeros, tendrán curvas idénticas de dicroísmo circular (CD) pero de diferente signo (Figura 4 b).

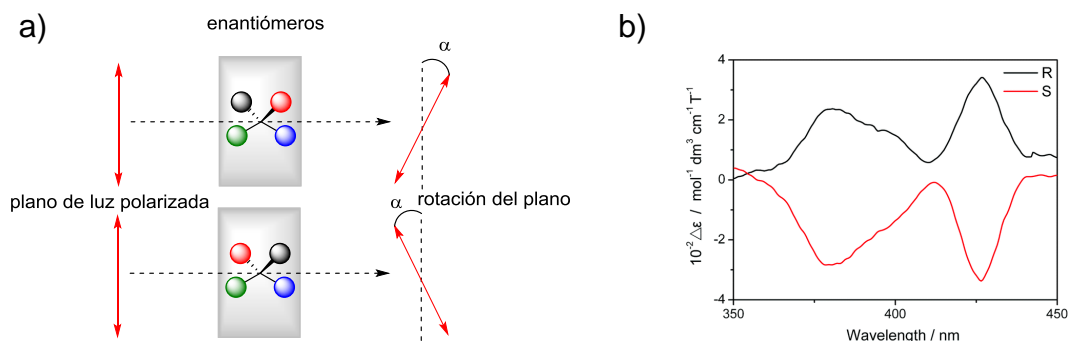


Figura 4. Rotación específica  $[\alpha_D]$  y curva de dicroísmo circular (CD) de dos enantiómeros.

La difracción de rayos X permite conocer la configuración absoluta de todos los centros asimétricos de la molécula, siempre que se consiga cristalizar y coordinar con un átomo pesado. Este proceso está muy limitado por la necesidad de obtener sólidos cristalinos, sobre todo en el ámbito de los productos naturales donde las cantidades suelen ser muy escasas. En función de la distancia entre los diferentes átomos de la molécula, y de mapas de densidad electrónica se puede determinar la configuración absoluta, siempre y cuando se haya podido coordinar con un átomo pesado. En caso de no haber sido así, sólo podría determinarse la configuración relativa de sus centros.

### 1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de RMN nos permite afrontar en ciertos casos la resolución de la estereoquímica relativa de dos o más centros asimétricos de una molécula. Estas técnicas no destructivas permiten disminuir en ocasiones el número de estereoisómeros posibles y facilitar la determinación de la configuración absoluta mediante el uso de derivatizaciones u otras técnicas experimentales. En el caso de sistemas rígidos, mediante el cálculo de constantes de acoplamiento o correlaciones espaciales obtenidas mediante experimentos ROESY y NOESY, es posible conocer la disposición espacial de ciertos grupos para relacionar dos o más centros quirales entre sí.



### 2.3.1. Base de datos universal: Kishi.

Entre los años 1999 y 2002, Kishi *et al.*<sup>17</sup> desarrollaron un nuevo procedimiento para la determinación la configuración absoluta de nuevos compuestos aislados, a partir de fragmentos estructurales de compuestos de configuración conocida. Mediante la comparación de los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del producto de configuración desconocida con los de los diferentes isómeros de los modelos descritos, se puede determinar la configuración relativa o absoluta del compuesto sometido a estudio.<sup>18</sup>

Las limitaciones de esta metodología residen en la necesidad de disponer de todos los estereoisómeros del fragmento a estudiar, lo que puede resultar muy tedioso, siendo necesario obtener perfiles diferentes y característicos para cada uno de ellos, aunque en ocasiones no resulta sencillo discernir entre uno u otro isómero.

---

<sup>17</sup> Lee, J.; Kobayashi, Y.; Tezuka, K.; Kishi, Y. *Org. Lett.* **1999**, 1, 2181–2184.

<sup>18</sup> Higashibayashi, S.; Czechtizky, W.; Kobayashi, Y.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14379–14393.

### 2.3.2. Asignación directa de la configuración relativa en sistemas 1,3-*n*-metilo

Con el fin de determinar la estereoquímica relativa de los centros quirales en sistemas 1,3-*n*-metilo, Schmidt y Breit<sup>19</sup> estudiaron en 2010 los desplazamientos químicos de los protones del grupo metileno intercalado entre ambos grupos sin necesidad de recurrir a derivatizaciones u otras técnicas más complejas. A partir del estudio de las conformaciones de ambos sistemas (Figura 5) propusieron que los entornos de los protones en sistemas con configuración *sin* serían diasterotópicos, mientras que en sistemas *anti*, donde los protones metilénicos tienen entornos similares, la diferencia entre los desplazamientos químicos de dichos protones sería menor.

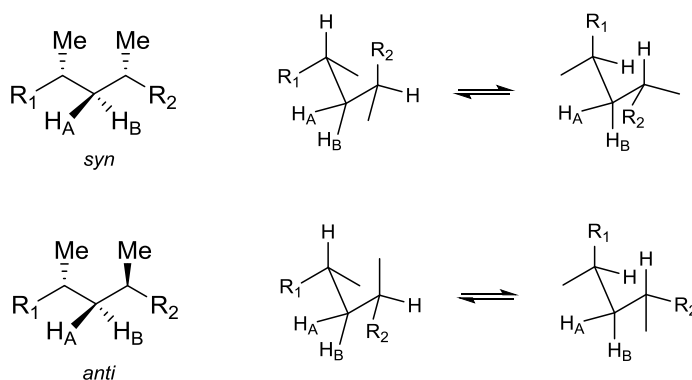


Figura 5. Conformación de los sistemas *sin* y *anti* 1,3-dimetilo.

<sup>19</sup> Schmidt, Y.; Breit, B. *Org. Lett.* **2010**, 12, 2218–2221.

El estudio se realizó en cerca de 80 productos naturales e intermedios de síntesis ya conocidos, donde se observó que la mayoría de compuestos con configuración *sin* mostraban una diferencia de desplazamiento químico entre los dos protones metilénicos de 0.0-0.2 ppm, mientras que la mayor parte de los compuestos con configuración *sin* exhibieron una diferencia mayor, entre 0.2 y 0.5 ppm. Debido a los diferentes sustituyentes de las cadenas laterales, es posible encontrar compuestos con configuración *anti* o *sin* entre valores de  $\Delta\delta$  de 0.1-0.4, por lo que este método solo es aplicable cuando se trabaja con valores extremos (Figura 6).

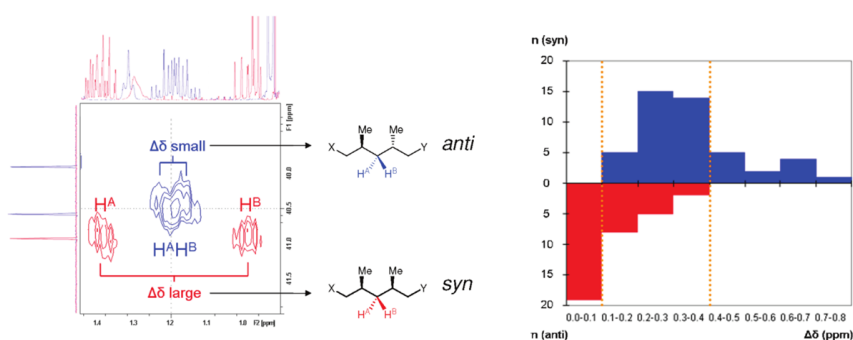


Figura 6. Valores de  $\Delta\delta$  para los compuestos conocidos estudiados. Extraído de la referencia 19.

### 2.3.3. El método de Murata, JBCA

La elucidación de la configuración relativa de sistemas no cíclicos fue desarrollada por Murata y col.<sup>20</sup> en 1999, a través del estudio de constantes homo (H-H) y heteronucleares (C-H) a dos y tres enlaces. Este método se basa en el estudio de los tres rotámeros mayoritarios en torno a los dos centros quirales adyacentes, a través de la comparación de las valores experimentales de  $^{2,3}J_{C,H}$  y  $^3J_{H,H}$ . Este método, también conocido como análisis configuracional basado en Js (JBCA), permite la determinación de la configuración relativa de sistemas carbonados con centros quirales en posiciones relativas 1,2 ó 1,3, mono o disustituidos por heteroátomos.

<sup>20</sup> Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.

La metodología consiste en comparar los valores teóricos de las constantes de acoplamiento  $^2,3J_{C,H}$  y  $^3J_{H,H}$  de cada uno de los rotámeros con el valor experimental medido a través de experimentos de RMN de  $^1H$  para las constantes homonucleares, y experimentos bidimensionales  $J$ -HMBC, HSQC-HECADE o HETLOC para las constantes heteronucleares.

En función del ángulo diedro que forman los diferentes átomos, se puede determinar el valor teórico de su constante de acoplamiento el homonuclear protón-protón. Cuando el ángulo es de 0 ó 180°, la curva de Karplus (Figura 7) alcanza un máximo, mientras que cuando el ángulo formado por los dos protones es de 90°, la curva alcanza su valor mínimo. De este modo, para los diferentes modelos estudiados, se clasifican las constantes de acoplamiento próximas al máximo como constantes grandes, mientras que las que se encuentran próximas al mínimo como pequeñas.

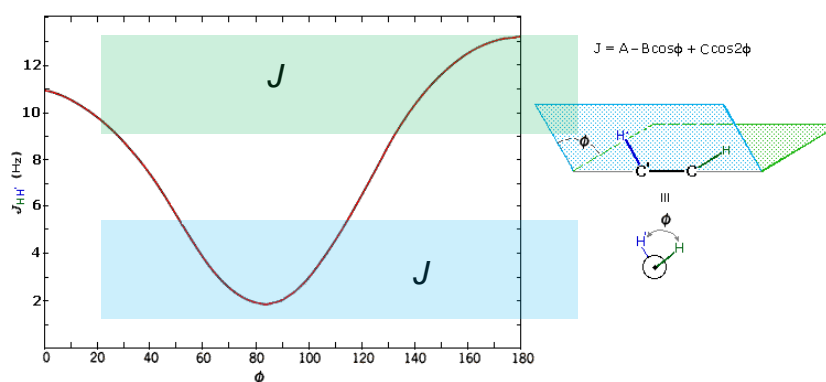
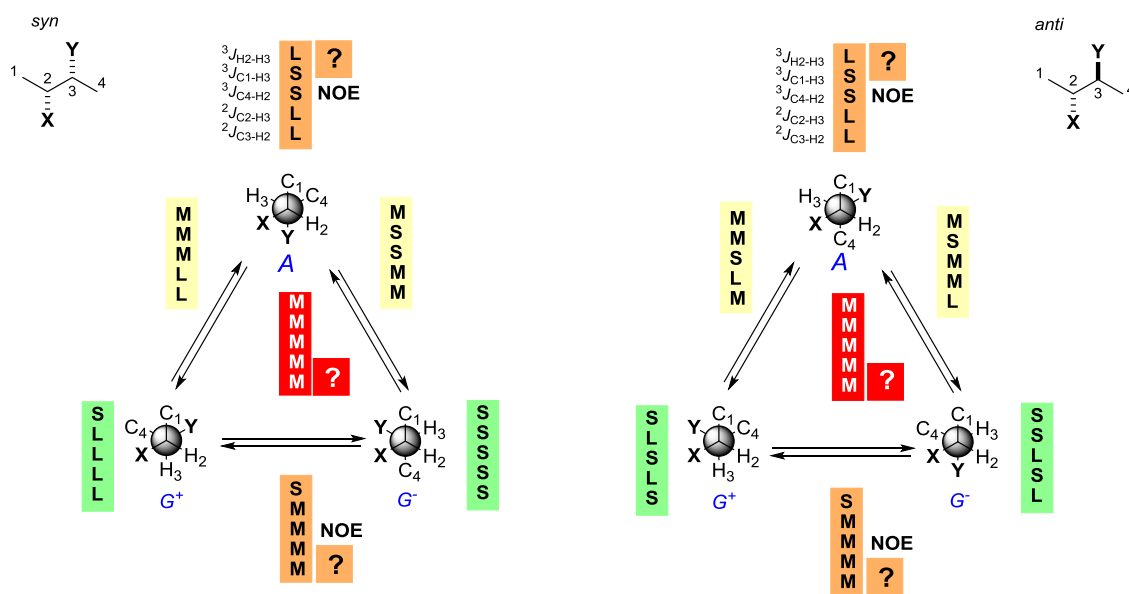


Figura 7. Curva de Karplus para el acoplamiento homonuclear H-H.

Para cada sistema, es necesario estudiar las dos posibles configuraciones espaciales *anti* y *syn*, y para cada una de ellas los tres posibles rotámeros mayoritarios: *antiperiplanar*, *sinclinal (gauche)+* y *sinclinal (gauche)-*. De esta forma, y como se muestra en la Figura 8, se obtienen 6 posibles rotámeros con valores independientes de constantes de acoplamiento entre los átomos pertenecientes al sistema que se está estudiando.



**Figura 8.** Patrón de constantes de acoplamiento para cada posible rotámero. Adaptado de la referencia 21.

Las constantes de acoplamiento  $^3J_{CH}$  y  $^3J_{HH}$  entre dos átomos en posición *antiperiplanar* son grandes, por lo que reciben la etiqueta L (large), mientras que cuando dos átomos se disponen en posición *sinclinal*, la constante de acoplamiento es pequeña y recibe la etiqueta S (small).

<sup>21</sup> Ardá, A.; Nieto, M. I.; Blanco, M.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. J. *Org. Chem.* **2010**, 75, 7227–7232.

Cuando uno de los átomos implicados es uno de los carbonos asimétricos que se están estudiando, se calcula la constante de acoplamiento que tendría el heteroátomo del carbono asimétrico con el protón correspondiente, y el valor de la constante entre ese protón y el carbono asimétrico sería la contraria. Por ejemplo, para medir la constante de acoplamiento entre C2 y H3 en el confórmero *antiperiplanar* del isómero con configuración *anti*, se calcula la constante de acoplamiento entre el heteroátomo que está sobre C2, que sería X, y H3. Como están en posición *sinclinal*, lo que equivale a una constante pequeña, la constante entre C2 y H3 es la contraria, por lo que sería grande. Con todo esto, se consigue una etiqueta para cada uno de los rotámeros, con una serie de constantes de acoplamiento característicos para cada sistema. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales clasificados según la Tabla 3, para obtener las coincidencias necesarias para clasificar el sistema como *sin* o *anti*.

**Tabla 3.** Valores de las  $^3J_{H-H}$  y  $^{2,3}J_{H-H}$  en Hz para los rotámeros *antiperiplanar* y *sinclinal*.

oxigenación	$^3J_{H-H}$		$^2J_{C-H}$		$^3J_{C-H}$	
	<i>antiperiplanar</i>	<i>sinclinal</i>	<i>antiperiplanar</i>	<i>sinclinal</i>	<i>antiperiplanar</i>	<i>sinclinal</i>
	grande	pequeña	grande	pequeña	grande	pequeña
ninguna	9-12	2-4	-	-	6-8	1-3
mono	8-11	1-4	-5 a -7	0 a -2	6-8	1-3
di	7-10	0-3	-4 a -6	2-0	5-7	1-3

Uno de los problemas encontrados al trabajar con sistemas no cíclicos, es la gran flexibilidad de rotación entorno al enlace entre los dos carbonos asimétricos, por lo que nos podemos encontrar mezclas de 2 ó 3 rotámeros en similar proporción. Cuando se tiene una mezcla de dos rotámeros mayoritarios, se obtienen unos valores de  $J$  medios correspondientes a los  $J$  de entre los dos rotámeros implicados. De este modo, si las constantes de acoplamiento de esos dos rotámeros son similares, ya sean grandes o pequeñas, el valor medio resultante se mantiene como grande o pequeño, pero si uno de los rotámeros tiene una constante grande y el otro una pequeña, se obtiene un valor resultante mediano para esa  $J$ .

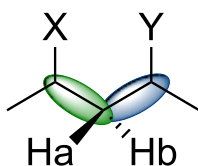
De ese modo se determinan las etiquetas resultantes de las medias de los dos rotámeros. En el peor de los casos, se pueden obtener mezclas de los tres rotámeros en similar proporción, en cuyo caso se obtiene una etiqueta donde todos los valores de  $J$  son medianos. Una vez analizados todos los escenarios posibles, observamos que cuando tenemos una mezcla de tres rotámeros en similar proporción, tanto la etiqueta del isómero *sin* como la del isómero *anti* son idénticas, por lo que no se podrían distinguir mediante esta metodología. Lo mismo ocurre con la etiqueta intermedia entre los rotámeros *sinclinal+* y *sinclinal-*. Para cualquiera de las dos situaciones, una de las alternativas planteadas y posteriormente publicada por nuestro grupo de investigación fue realizar las medidas experimentales a baja temperatura, con el fin de desplazar el equilibrio rotacional a un sistema donde predomine uno de los rotámeros. La comparación de las medidas de las constantes de acoplamiento homo/heteronucleares a baja temperatura con las obtenidas a temperatura ambiente permite saber las tendencias de variación de las mismas y a partir de estas tendencias se puede deducir la estereoquímica de los centros quirales implicados.<sup>22</sup>

Por último, si se observan las etiquetas de los dos rotámeros *antiperiplanar* en los isómeros *sin* y *anti*, los valores de las  $J$  son idénticas. Una posible solución para discernirlos es recurrir a experimentos de RMN de disposición espacial tipo ROESY.

---

<sup>22</sup> Ardá, A.; Nieto, M. I.; Blanco, M.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7227–7232.

Cuando se estudian sistemas 1,3 disustituídos, el procedimiento requiere que los protones pertenecientes al metileno intercalado entre ambos centros quirales, sean lo suficiente diasterotópicos. De este modo, se aplica el método desarrollado anteriormente a la disposición espacial entre los átomos de cada uno de los centros asimétricos y cada uno de los protones metilénicos, para finalmente relacionarlos entre sí (Figura 9).



**Figura 9.** Metodología JBCA en sistemas 1,3-disustituídos.



## 1.4. Derivatización química

### 2.4.1. Derivatización quiral de alcoholes secundarios y ácidos carboxílicos.

Como los espectros de resonancia magnética nuclear de dos enantiómeros son idénticos, tenemos que introducir alguna modificación que logre diferenciarlos estereoquímicamente para obtener espectros diferentes. Esto se puede conseguir mediante la introducción de un reactivo quiral que interaccione con nuestros compuestos y obtener así diferentes espectros de RMN. Para ello, se puede utilizar un disolvente quiral o reactivos quirales que se unan con nuestra molécula mediante un enlace covalente.<sup>23</sup> Esta reacción fue propuesta por H.R. Mosher<sup>24</sup> y *col.* en 1973 y su modificación usada actualmente fue propuesta por Ohtani<sup>25</sup> y *col.* en 1990. Esta metodología permite determinar la configuración absoluta de algunos centros quirales de la molécula que contengan y tengan próximos determinados grupos funcionales como alcoholes, aminas, ácidos o amidas.

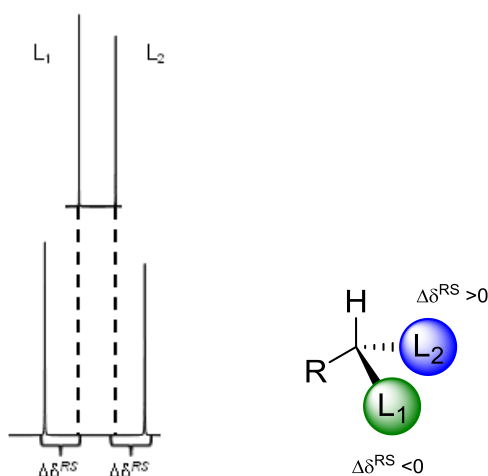
---

<sup>23</sup> Seco, J.M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. *The Assignment of the Absolute Configuration by NMR Using Chiral Derivatizing Agents* **2015** Oxford University Press.

<sup>24</sup> Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512–519.

<sup>25</sup> Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.

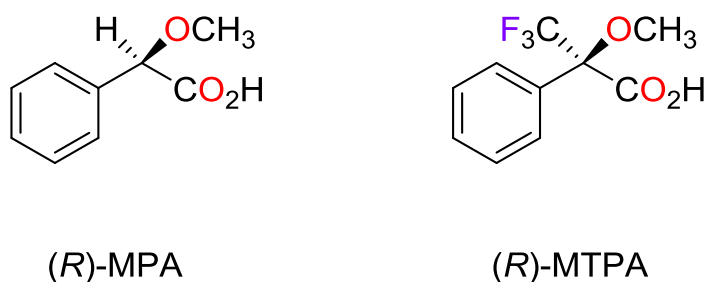
El proceso a seguir consiste en determinar la configuración absoluta de uno o varios centros de una molécula. Para ello, se derivatiza el compuesto de forma separada con cada uno de los dos enantiómeros del reactivo quiral, para obtener los dos derivados diastereoisómeros. La comparación de los dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtenidos permite localizar ambos ligandos en el espacio alrededor del carbono asimétrico, y conocer así la configuración absoluta (Figura 10). El estudio de los desplazamientos de protón en los espectros de resonancia, determinará la disposición que adopten los sustituyentes alrededor del carbono asimétrico, y esta permitirá a su vez, determinar la configuración absoluta.



**Figura 10.** Representación esquemática del uso de reactivos quirales.

A pesar de ello, no todos los reactivos quirales son adecuados para la determinación de la configuración de un centro quiral, ya que debe existir una correlación entre los desplazamientos químicos de los sustituyentes y la disposición espacial de estos.

Los derivados de ácidos arilmetoxiacéticos (AMAAs) son los más empleados (Figura 11), ya que la aplicación a un gran número de sustratos ha permitido validar los resultados obtenidos y determinar en profundidad su mecanismo de acción. Estos reactivos se caracterizan por la presencia de un grupo polar, un punto de unión al sustrato (ácido carboxílico, hidroxilo, amino...) y un grupo con anisotropía magnética (anillo aromático, carbonilo...).



**Figura 11.** Reactivos quirales más utilizados en el estudio de alcoholes secundarios.

Uno de los principales usos de estos agentes es para la determinación de la configuración absoluta de carbonos asimétricos en alcoholes secundarios. La unión del grupo hidroxilo del alcohol unido al carbono asimétrico con el agente quiral a través del ácido carboxílico, resulta en la formación de un éster donde el protón del centro quiral y el protón o el grupo trifluoruro del agente quiral (dependiendo del uso de MPA o MTPA) se sitúan en el mismo plano.

Es entonces, cuando el efecto apantallante producido por el anillo aromático del reactivo quiral ejerce su influencia sobre el ligando más próximo afectando a su desplazamiento, (Figura 12) permitiendo la translación de la información estereoquímica del grupo auxiliar (conocida la estereoquímica absoluta) al sustrato (hidroxilo de configuración desconocida).

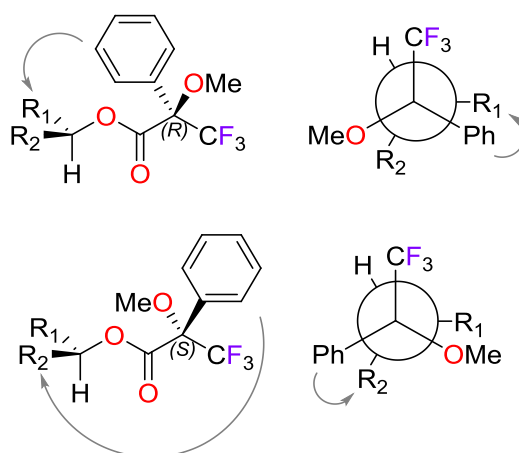
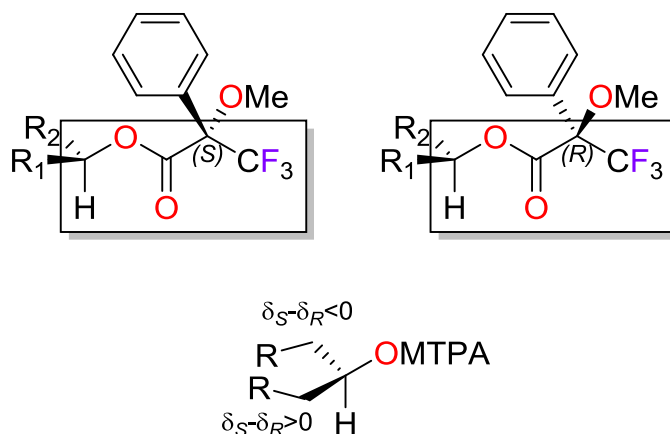


Figura 12. Efecto apantallante del grupo fenilo sobre el sustrato con MPA en alcoholes secundarios.

De esta forma, al hacer reaccionar el alcohol con los dos enantiómeros del agente quiral, se obtienen los dos ésteres diastereoisómeros. Si se restan los desplazamientos de los protones cercanos al carbono simétrico del éster S menos los del R, se obtienen valores positivos para aquellos protones que han sufrido el apantallamiento del anillo aromático en el éster R y valores negativos para aquellos que lo han sufrido en el éster S.<sup>26</sup> Si se sitúa el éster y el protón del sustrato en el mismo plano, y el grupo de señales con valores de  $\Delta\delta_{RS}$  positivos por delante del plano, y las negativas hacia detrás, se determina la configuración absoluta del carbono asimétrico estudiado (Figura 13).

<sup>26</sup> Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2451–2458.



**Figura 13.** Determinación de la configuración absoluta del carbono asimétrico con MTPA en alcoholes secundarios.

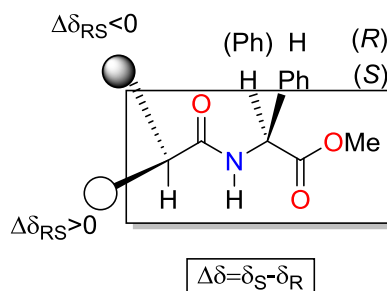
La asignación de la configuración absoluta mediante el uso de reactivos quirales, suele realizarse mediante el experimento de RMN  $^1\text{H}$ . Esto es debido a la necesidad de una menor cantidad de muestra y a que los experimentos son más rápidos que usando otros núcleos. Actualmente, los avances tecnológicos en la espectroscopia de RMN, permiten el uso de esta metodología con experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,<sup>27</sup> observándose que usando únicamente los desplazamientos de carbono o en combinación con los de protón se obtienen excelentes resultados.

Al igual que con los derivados de AMAAs, el reactivo éster metílico de la fenilglicina (PGME) permite, de modo similar, la elucidación de la configuración absoluta de ácidos acéticos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos o ácidos propiónicos  $\beta,\beta$ -disustituidos con grupos hidroxilo, alcoxilo y aciloxilo<sup>28</sup> La metodología se aplica de igual forma que el método de Mosher, haciéndose reaccionar el sustrato con los dos enantiómeros del reactivo PGME. En esta ocasión, dependiendo de si se trata de un ácido acético  $\alpha,\alpha$ -disustituido o de un ácido propiónico  $\beta,\beta$ -disustituido, los desplazamientos de las amidas se restan de forma diferente.

<sup>27</sup> Louzao, I.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7903–7905.

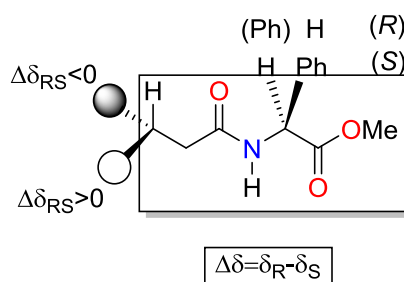
<sup>28</sup> Yabuuchi, T.; Kusumi, T. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 397–404.

Cuando el sustrato es un ácido acético  $\alpha,\alpha$ -disustituido, la amida formada, el éster del reactivo y el protón del ácido se disponen en el mismo plano. De esta forma, se restan los desplazamientos químicos de la amida  $R$  con los de la amida  $S$ , colocándose los valores positivos por encima del plano y los negativos por debajo. De esta forma se obtiene la configuración absoluta del ácido estudiado (Figura 14).



**Figura 14.** Determinación de la configuración absoluta con PGME de un ácido acético  $\alpha,\alpha$ -disustituido.

Por el contrario, cuando el sustrato es un ácido propiónico  $\beta,\beta$ -disustituido (Figura 15), el metileno que se encuentra entre el carbono asimétrico y la amida formada obliga a tomar una conformación diferente, teniendo que restar los desplazamientos químicos de la amida  $S$  con los de la amida  $R$ .



**Figura 15.** Determinación de la configuración absoluta con PGME de un ácido propiónico  $\beta,\beta$ -disustituido.

## 2.4.2. Formación de acetónidos en sistemas 1,3-dioles.

La resolución de la configuración relativa en sistemas 1,3-dioles, fue propuesta por S.D. Rychnovsky *et al.*<sup>29</sup> en 1993. Los desplazamientos químicos de carbono obtenidos mediante RMN de  $^{13}\text{C}$  de los metilos resultantes de formar un acetónido en el sistema 1,3-diol, permiten diferenciar sistemas *sin* y *anti*. En general, los acetónidos formados a partir de sistemas *sin*-1,3-diol tienen unos valores de desplazamiento de carbono para los metilos de 19 y 30 ppm y para el carbono acetal 98.5 ppm. Por otro lado, los acetónidos obtenidos a partir de sistemas *trans*-1,3-diol, ambos metilos resuenan con un valor de desplazamiento químico de 25 ppm y el acetal con un valor de 100.5 ppm.

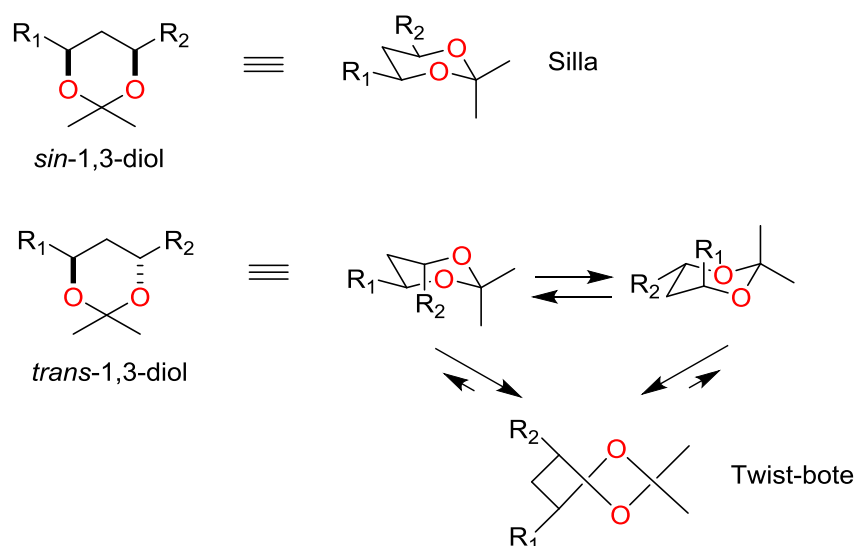


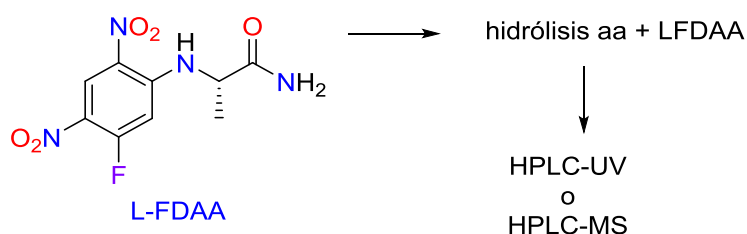
Figura 16. Conformación espacial de los sistemas *sin* y *anti*-1,3-diol.

<sup>29</sup> Rychnovsky, S. D.; Rogers, J. B.; Yang, G. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3511–3515.

### 2.4.3. Determinación de la configuración absoluta de aminoácidos en compuestos peptídicos.

Cuando se estudian las propiedades espectroscópicas de los aminoácidos, surge la dificultad de diferenciar las diferentes parejas de enantiómeros. Los aminoácidos están habitualmente presentes en los diferentes metabolitos secundarios encontrados en organismos marinos, por lo que su determinación de su estereoquímica supone un desafío a la hora de estudiar su configuración absoluta.

El uso de la amida 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina (Figura 17) como reactivo quiral para la determinación de la estereoquímica de aminoácidos fue propuesto por P. Marfey<sup>30</sup> en 1984. Al hacer reaccionar el reactivo de Marfey con la pareja de aminoácidos enantioméricos se forman sus respectivos diastereoisómeros, que son fácilmente separables mediante HPLC sin necesidad del uso de columnas quirales. El diastereoisómero más retenido suele ser casi siempre el D debido a la mayor interacción del enlace hidrogeno con la fase reversa de la columna. Estos compuestos se pueden detectar mediante el máximo de UV de 340 nm del reactivo de Marfey, o mediante extracción iónica en un espectrómetro de masas como detector acoplado al HPLC, lo que permite llevar a cabo el experimento con cantidades muy pequeñas de sustrato.

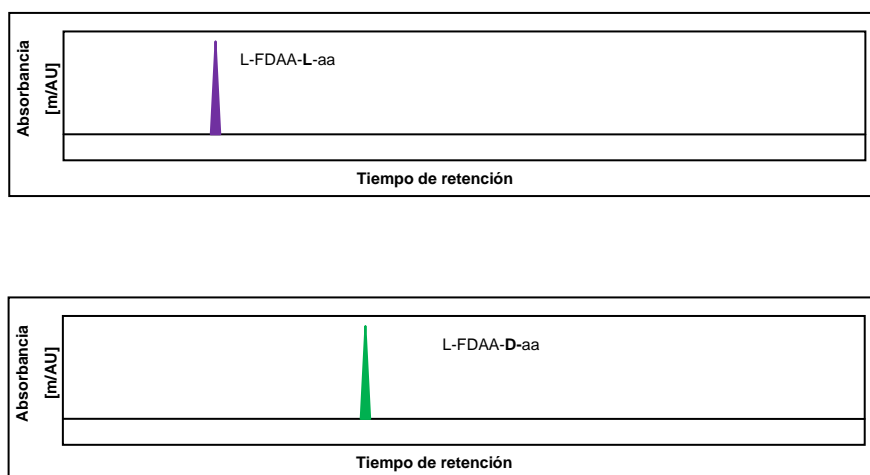


**Figura 17.** Reactivo de Marfey L-FDAA y su aplicación en la determinación de la configuración absoluta de aminoácidos.

<sup>30</sup> Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, 49, 591–596.



El procedimiento<sup>31</sup> consiste, en primer lugar, en la obtención de los aminoácidos libres del péptido a estudiar, lo cual se consigue en la mayoría de los casos rompiendo el enlace peptídico con una hidrólisis ácida, y a continuación en hacerlos reaccionar con el reactivo L-FDAA. A su vez, se obtienen los derivados de L-FDAA de los patrones (comerciales u obtenidos de forma sintética) de los aminoácidos a estudiar (Figura 18). El análisis de los patrones, mediante HPLC acoplado a DAD y/o masas, permite conocer los tiempos de retención de los diferentes isómeros de aminoácidos del péptido a estudiar. Finalmente, la comparación del tiempo de retención de los patrones derivatizados con el de los aminoácidos derivatizados del sustrato permite establecer su configuración absoluta en el compuesto objeto de estudio.



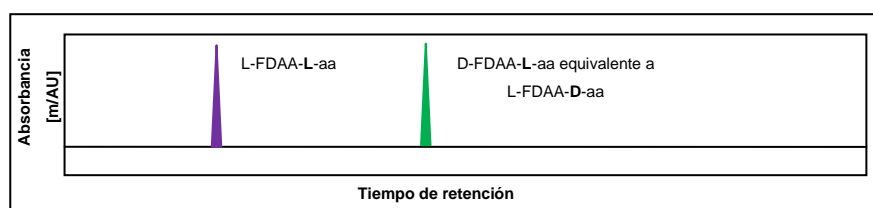
**Figura 18.** Cromatograma de los dos diastereoisómeros formados con la unión del reactivo L-FDAA al aminoácido estudiado.

Debido a la dificultad de conseguir en algunas ocasiones todos los patrones, Fujii y *col.*<sup>32</sup> desarrollaron el método avanzado de Marfey. Este método consiste en la separación de los aminoácidos derivatizados con el reactivo de Marfey, pero utilizando los reactivos L-FDAA y D-FDAA con el fin de sustituir los patrones no disponibles por su enantiómeros.

<sup>31</sup> Bhushan, R.; Brückner, H. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, 879, 3148–3161.

<sup>32</sup> Fujii, K.; Shimoya, T.; Ikai, Y.; Oka, H.; Harada, K. I. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2579–2582.

Mediante la derivatización con L-FDAA era necesario tener todos los diastereoisómeros de un mismo aminoácido para poder comparar sus tiempos de retención con el del aminoácido derivatizado del sustrato a estudiar. Con el método avanzado de Marfey, se realiza una derivatización con los dos enantiómeros D y L del FDAA, siendo por tanto suficiente disponer de uno de los enantiómeros del aminoácido. Por ejemplo, al derivatizar solo el L, se obtendrán los diastereoisómeros L-FDAA-L-aa y el D-FDAA-L-aa que mostrarán distintos tiempos de retención en HPLC (Figura 19) y por tanto, se podrán determinar los tiempos de retención de los aminoácidos L-aa y D-aa teniendo solamente disponible el L-aa. En caso de no conocer cuál de los dos aminoácidos derivatizados tiene mayor tiempo de retención, se realiza por separado una derivatización L-FDAA para conocer el tiempo de retención del aminoácido L-aa derivatizado.



**Figura 19.** Derivatización con el DL-FDAA empleando el método avanzado de Marfey.

Para la determinación de la estereoquímica de aminoácidos con más de un centro asimétrico, sería necesario disponer de todos los isómeros posibles para la resolución de la geometría mediante el método de Marfey, pero sólo uno de cada pareja de enantiómeros si se recurre al método avanzado de Marfey.

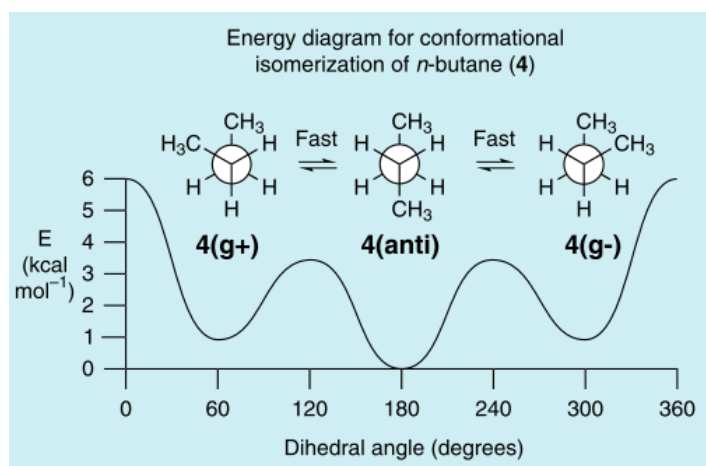
### 1.5. Cálculos computacionales

De todas las técnicas espectroscópicas aplicables a la determinación de la estructura de nuevos compuestos orgánicos, la resonancia magnética nuclear es una de las más potentes. Dentro de los tres tipos de datos importantes que nos ofrece esta técnica, desplazamiento químico, constantes de acoplamiento e integración relativa de las señales, son los valores de los desplazamientos químicos, los que nos dan información acerca del entorno magnético en el que se encuentra cada átomo. De acuerdo a esto, las técnicas desarrolladas en la química computacional durante los últimos años, nos permiten calcular propiedades espectroscópicas teóricas para compararlas con los datos obtenidos en el laboratorio. En esta ocasión, se explicará con más detalle el cálculo teórico de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ya que son las técnicas utilizadas en los capítulos posteriores, aunque mediante el uso de cálculos computacionales, se pueden predecir otras propiedades físicas como el perfil UV, IR y dicroísmo circular.

La técnica más utilizada para la realización de cálculos computacionales en la simulación de espectros de RMN, son los métodos de funcionales de densidad (DFT). Este proceso es muy similar al de los cálculos *ab initio*, donde el funcional de energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. La importancia de esta metodología se vio reconocida en 1998 cuando el premio Nobel de química fue otorgado a quién la desarrolló, Walter Kohn.

El uso de esta técnica está cada vez más expandido en el mundo de la química orgánica, lo que supone el desarrollo de software cada vez más accesible. A continuación, se explican brevemente los diferentes pasos a seguir a la hora de calcular el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$  mediante cálculos DFT siguiendo el protocolo de Willoughby y *col.*<sup>33</sup> publicado en la revista Nature Protocols. Es importante recordar, que los espectros de RMN de dos enantiómeros son idénticos, por lo que esta metodología nos permite resolver las configuraciones relativas pero no las absolutas.

- El primer paso consiste en una búsqueda conformacional (Figura 20) para cada uno de los posibles diastereoisómeros. El número de diastereoisómeros dependerá del número de centros quirales que queden sin relacionar entre sí. Este proceso se lleva a cabo en un software del tipo PCModel o MacroModel. Se utilizan campos de fuerza moleculares donde la ventana de energía que se utiliza suele estar entre 5-3 kcal/mol.



**Figura 20.** Diagrama de energía de la isomerización conformacional del *n*-butano. Adaptada de la referencia 33

<sup>33</sup> Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, 9, 643–660.

- Cada uno de los conformeros obtenidos, se minimiza utilizando cálculos DFT, con el fin de conocer su energía libre y su aportación a la propiedad física que se va a calcular mediante la distribución de Boltzmann. El funcional más utilizado cuando se utiliza Gaussian es el B3LYP con uno de los conjuntos base que incluyen funciones de polarización para átomos de hidrógeno, 6-31G (d), 6-31G (d,p) o 6-31+G(2d,p), siendo este último el más utilizado en cálculos de espectros de RMN.
- Mediante el método GIAO (gauge-independent atomic orbitals) en Gaussian, se calcula el tensor de apantallamiento de RMN. El uso de este tensor de apantallamiento, permite obtener los desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para cada conformero en función del desplazamiento del TMS. Es importante añadir en los cálculos los efectos de solvatación del disolvente, por lo que se indicará en los cálculos el disolvente en el que se llevan a cabo las medidas experimentales.
- Obtenidos los valores energéticos de cada uno de los conformeros, el siguiente paso es calcular su aportación al espectro de RMN, con lo que se obtiene un espectro de RMN teórico con la media ponderada de todos ellos. De esta forma, se obtiene un único espectro de RMN para cada uno de los isómeros.

- Finalmente se comparan los desplazamientos químicos obtenidos para cada diastereoisómero con los desplazamientos experimentales con el fin de conocer el candidato que más se aproxima a los valores reales. Existen diferentes alternativas como la regresión lineal o el uso de MAE, aunque recientemente el uso del método de probabilidad DP4<sup>34</sup> está cada vez más extendido, especialmente mediante la aplicación desarrollada por el grupo del Godmann.<sup>35</sup> En los últimos años, una versión mejorada del método de probabilidad, llamado DP4+, fue desarrollado por Sarotti y col.<sup>36</sup>

---

<sup>34</sup> Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946–12959.

<sup>35</sup> <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>

<sup>36</sup> N. Grimblat, M. M. Zanardi, A. M. Sarotti, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12526–12534.

### 3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL AISLAMIENTO DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA

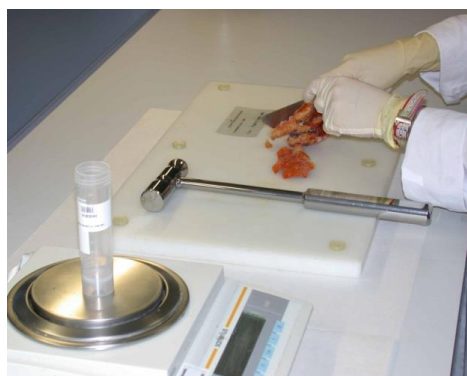
Con el objetivo de explicar la metodología llevada a cabo para el aislamiento de los nuevos compuestos estudiados en los próximos capítulos, se detalla a continuación los pasos llevados a cabo con todas las muestras recogidas por el departamento de Expediciones de PharmaMar (Figura 21), y que se someten a continuación a los procesos de aislamiento, purificación y determinación estructural por los diferentes grupos de I+D de la compañía.



**Figura 21.** Recolección de muestras por el equipo de buzos de PharmaMar.

Cada año, miles de muestras son recogidas y clasificadas del fondo de mares y océanos del todo el mundo, por el equipo de buzos de PharmaMar con el propósito de encontrar nuevas cabezas de serie con propiedades citotóxicas. Para ello, se comienza con un ensayo farmacológico en un panel de cuatro líneas celulares tumorales (A-549, HT-29, MDA-MB-231 y PSN-1) para detectar la presencia de citotoxicidad de un extracto obtenido a partir de 2 g (Figura 22) de muestra, permitiéndonos predecir la existencia de metabolitos secundarios citotóxicos.

Aquellas muestras que muestran valores de citotoxicidad menores a 25  $\mu\text{g/mL}$ , son sometidas a un fraccionamiento inicial con un gradiente de disolventes en orden decreciente de polaridad (agua-metanol-diclorometano), con el fin de concentrar la actividad en fracciones diferentes desde el punto de vista químico.



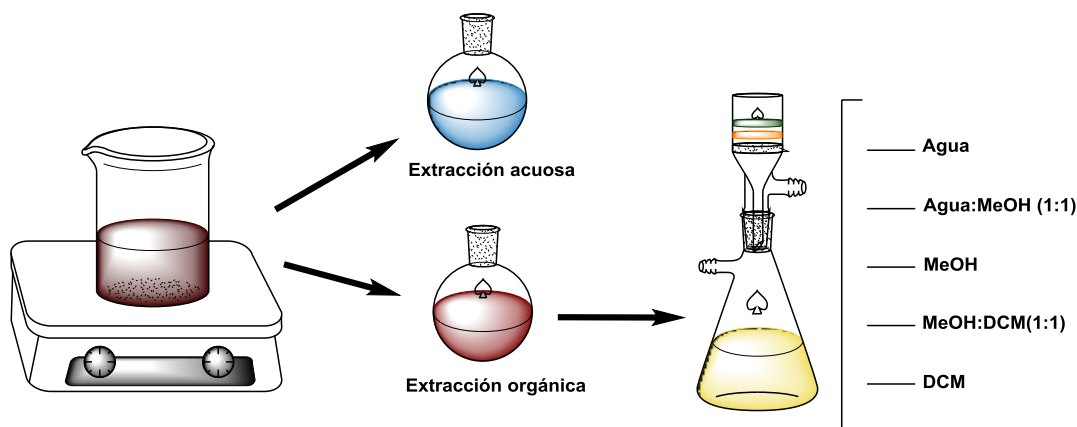
**Figura 22.** Preparación de 2 g representativos de una muestra de origen marino.

Después de tres décadas estudiando metabolitos procedentes de organismos marinos, PharmaMar cuenta con una colección de más de 5000 compuestos puros de origen marino, por lo que es necesario reconocer en el primer cribado si existen metabolitos conocidos que pudieran ser responsables de la actividad en el primer cribado, ya han sido aislados previamente por el departamento de Productos Naturales. Para ello, todas las extracciones que han presentado actividad inicial, se analizan por UPLC acoplado a masas de alta resolución con detección TOF, en donde se comparan perfiles cromatográficos, tiempos de retención y espectros de masas de los picos detectados, con compuestos puros de nuestra base de datos. Todo este proceso se denomina desreplicación y es clave para reproducir resultados ya encontrados anteriormente.



Sólo son estudiadas en profundidad por el departamento de Productos Naturales aquellas muestras que contengan metabolitos secundarios activos y que no hayan sido aislados con anterioridad. Estos ensayos iniciales, permite descartar un alto porcentaje de muestras que no cumplen con los requisitos establecidos, y que supondrían un gasto de recursos innecesario. Una vez seleccionadas las muestras con potencial para el aislamiento de nuevas moléculas activas, el estudio se realiza sobre el 80% del peso de cada una de ellas, con el fin de conservar muestra de todas ellas para futuros estudios.

Cada muestra por separado, se trocea y se somete a una extracción sólido-líquido con una fase orgánica de metanol-diclorometano (1:1), y posteriormente, una vez eliminado el disolvente, se añade agua con el fin de extraer aquellos compuestos más polares. La fase orgánica, en donde se concentran habitualmente los compuestos con actividad, se somete a una cromatografía líquida con vacío (VLC) en fase reversa, mediante la utilización de diferentes mezclas de disolventes en orden decreciente de polaridad (Esquema 1).



**Esquema 1.** Esquema de la extracción y fraccionamiento mediante VLC-RP.

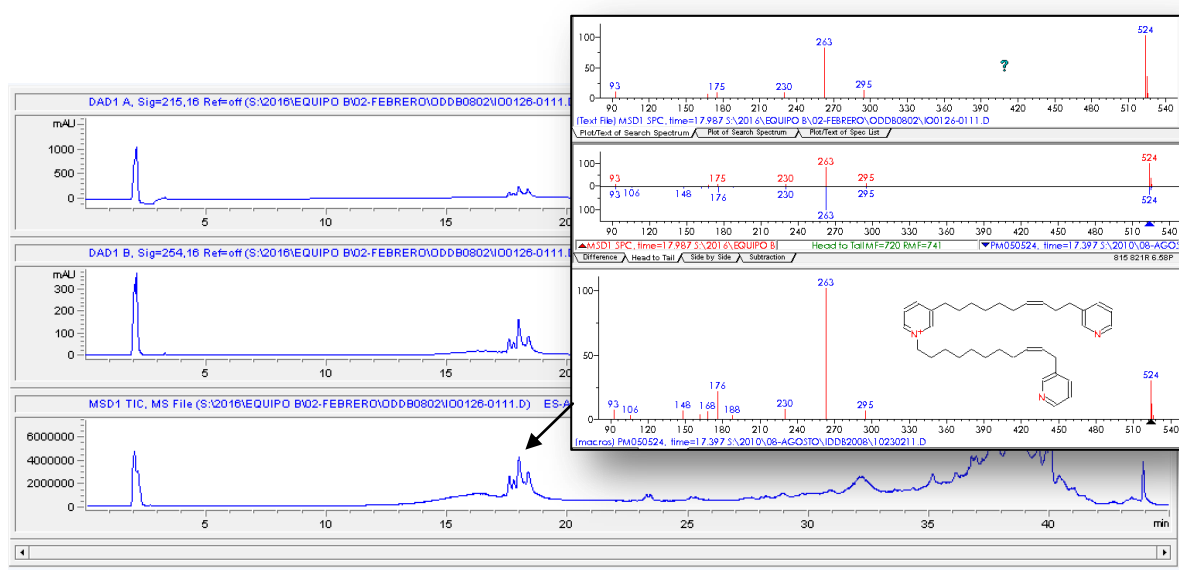
Todas las fracciones obtenidas tanto en este proceso como en purificaciones posteriores mediante cromatografía flash o HPLC, se envían al Departamento de Screening de PharmaMar con el fin de evaluar la presencia de metabolitos activos. Una alícuota de cada una de las fracciones (0,15 mg) se analiza en el ensayo de citotoxicidad frente a un panel de cuatro líneas celulares: A549 (células epiteliales basales de adenocarcinoma humano alveolar), HT-29 (células epiteliales basales de adenocarcinoma humano colorrectal), MDA-MB-231 (células epiteliales basales de adenocarcinoma humano de mama) y PSN-1 (células epiteliales basales de adenocarcinoma humano de páncreas).<sup>37</sup> Las células se siembran en placas de 96 pocillos y se dejan 24 horas a 37 °C para que se adhieran a la base. Al día siguiente, se tratan con las diferentes fracciones a concentraciones de 25, 5 y 1 µg/mL. A las 48 horas, se fijan las células que siguen vivas, y se tiñen con sulforrodamina, con el fin de evaluar mediante colorimetría, la actividad de cada una de las fracciones. Para ello como control interno se utilizan células sin tratamiento, células tratadas con un compuesto citotóxico conocido y matrices sin células.

---

<sup>37</sup> Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.

### Desreplicación

Aquellas fracciones que presentan actividad en las diferentes etapas del fraccionamiento, se estudian mediante espectrometría de masas de baja resolución, comparándose sus perfiles de masas cromatográficos con la base de datos desarrollados por PharmaMar a través del programa NIST MS Search 2.0. De este modo, se detectan compuestos conocidos que antes no se habían detectado en el ensayo inicial. Este proceso de desreplicación nos permite centrar los esfuerzos en el aislamiento de nuevos compuestos activos (ver Figura 23).



**Figura 23.** Desreplicación de un compuesto conocido en una muestra nueva.

Tras la determinación estructural de los nuevos compuestos puros aislados, se estudia su citotoxicidad en un ensayo estandarizado. Para ello, se utiliza el mismo panel celular de 4 líneas, pero en esta ocasión se mide su nivel de citotoxicidad a 10 concentraciones seriadas diferentes, con el fin de obtener su curva dosis-respuesta (Figura 24). Para poder comparar con las actividades publicadas por otros investigadores, la incubación con el compuesto continúa durante 72 h. De las curvas dosis-respuesta, se obtienen los valores de  $GI_{50}$  (inhibición del 50% de crecimiento celular), TGI (inhibición total del crecimiento) y  $LC_{50}$  (dosis letal del 50% de las células), donde el  $GI_{50}$  es el valor de referencia a la hora de hablar de la actividad citotóxica de un compuesto.<sup>38</sup>

<sup>38</sup> Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.

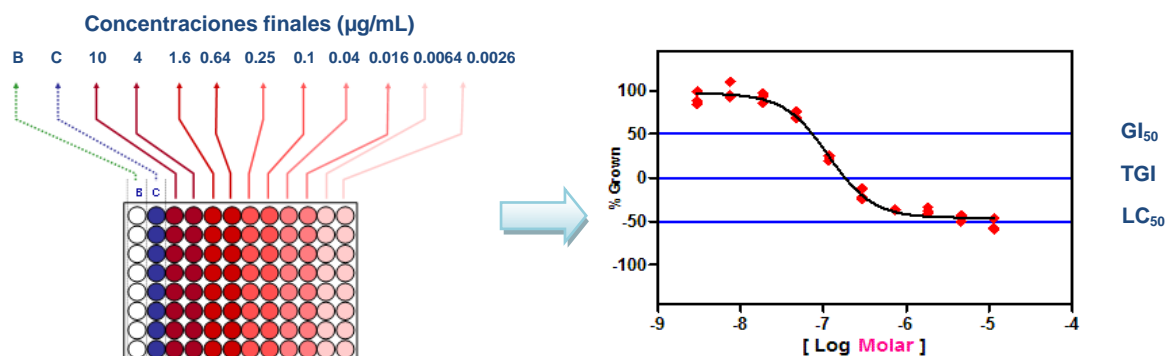


Figura 24. Curva dosis-respuesta de un compuesto puro antitumoral

Los nuevos compuestos aislados son introducidos en las diferentes bases de datos junto con toda la información obtenida sobre ellos (características espectroscópicas, datos de actividad, perfil cromatográfico...), para poder desreplicar en el futuro.

Es fundamental la protección confidencial de todos los compuestos aislados por la compañía, con el fin de proteger posibles desarrollos clínicos. Por ello, el Departamento de Patentes de PharmaMar, se ocupa de proteger mediante patentes la información relacionada con los posibles cabezas de serie aislados por la compañía.

*CAPÍTULO II*  
*HEXADELLA SP. CF*  
*INDICA*

## 2. ESTUDIO DE LA ESPONJA *HEXADELLA* SP CF INDICA.

La esponja de la especie *Hexadella* sp cf. *indica*, del género *Hexadella* sp. y de la familia *Ianthellidae* pertenece al orden Verongida (Esquema 2). Posee un esqueleto fibroso y presenta una construcción anastomósala o dendrítica. La estructura típica es una corteza laminar que rodea una médula fibrilar. En ocasiones poseen espículas fibrosas que se separan del esqueleto principal, presentando una textura que refleja la naturaleza de la matriz de colágeno, deformable y carnosas.<sup>39</sup> Aunque la mayoría de las esponjas del orden Verongida son de colores claros cuando se encuentran en el océano, se oxidan tornando a un color oscuro cuando son expuestas al oxígeno atmosférico. La dificultad de su estudio taxonómico reside en la variedad de color, forma, consistencia y estructura del esqueleto. Además, las esponjas del Orden Verongida suelen carecer de espículas, siendo necesario para su clasificación taxonómica el estudio del tamaño y tipo de las fibras de la esponja, así como el patrón que estas forman.<sup>40</sup> En general, la caracterización de las esponjas carentes de un esqueleto mineral es realmente difícil, especialmente para las especies de *Hexadella*. La identificación de estas esponjas requiere un estudio completo combinando estudios morfológicos y citológicos con perfiles bioquímicos y valoración de su actividad. Su color en la naturaleza, su crecimiento o el color que toma una fijación metanólica en el laboratorio, permite en ciertas ocasiones distinguir unas especies de otras.<sup>41</sup>

Los compuestos bromados derivados de la tirosina, al ser característicos de las distintas especies del orden Verongida, han sido utilizados como marcadores quimiotaxonómicos de estas esponjas.<sup>42</sup>

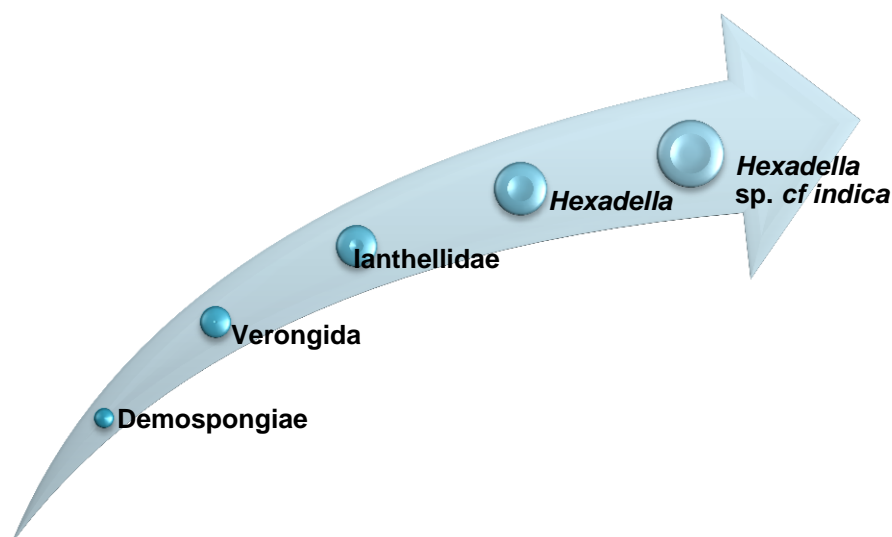
---

<sup>39</sup> Bergquist, P. R.; Cook, S. D. C. *Systema Porifera*, **2002**, 1081-1081

<sup>40</sup> Ehrlich, H.; Ilan, M.; Maldonado, M.; Muricy, G.; Bavestrello, G.; Kljajic, Z.; Carballo, J. L. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, 47, 132–140.

<sup>41</sup> Reveillaud, J.; Allewaert, C.; Pérez, T.; Vacelet, J.; Banaigs, B.; Vanreusel, A. *Invertebr. Syst.* **2012**, 26, 230-248.

<sup>42</sup> Gotsbacher, M.; Karuso, P. *Mar. Drugs* **2015**, 13, 1389–1409.



Esquema 2. Clasificación de las esponjas *Hexadella* sp. cf. *indica*.

### 2.1. Precedentes de compuestos aislados de esponjas del género *Hexadella*

Se conocen más de 100 estructuras aisladas de esponjas del género *Hexadella*, caracterizándose por la ausencia de terpenos, la presencia de un alto porcentaje de esteroides derivados del esqueleto de aplustano, y una gran diversidad de metabolitos secundarios halogenados,<sup>43</sup> siendo en su mayoría compuestos bromados, derivados no sólo de la bromotirosinas como el hexadellin A,<sup>44</sup> sino también derivados de bromo índoles como las topsentinas,<sup>6</sup> dragmacidinas<sup>45</sup> y dragmacidonas<sup>46</sup> (ver Figura 25):

<sup>43</sup> Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pansini, M. J. *Nat. Prod.* **2000**, 63, 263–266.

<sup>44</sup> Morris, S. A.; Andersen, R. J.; *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 677–681.

<sup>45</sup> Cutignano, A.; Bifulco, G.; Bruno, I.; Casapullo, A.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. *Tetrahedron* **2000**, 56, 3743–3748.

<sup>46</sup> Morris, S. A.; Andersen, R. J. *Tetrahedron* **1990**, 46, 715–720.

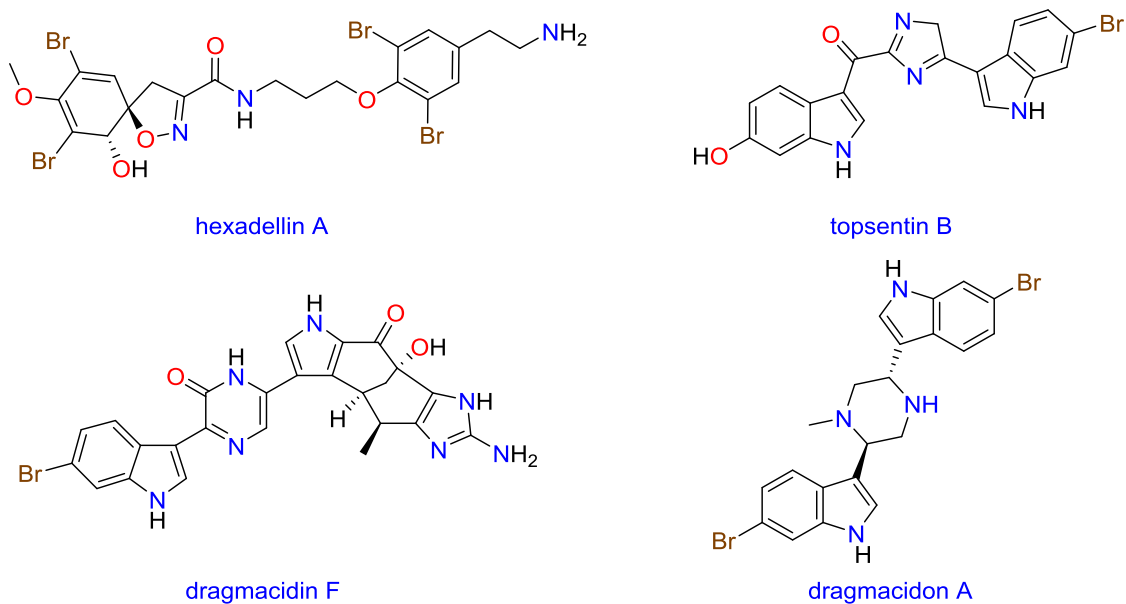
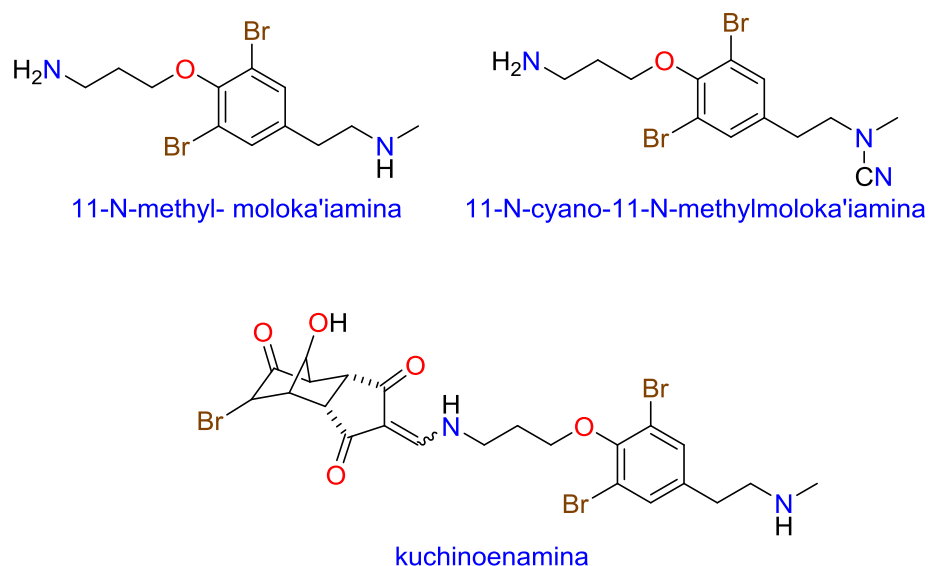


Figura 25. Compuestos aislados de *Hexadella*.

Algunos de los compuestos aislados de esponjas del género *Hexadella*, como el dragmacidon A, presentan actividad citotóxica en diferentes líneas celulares, mientras que otros, como el 11-*N*-methyl- moloka'iamina, 11-*N*-cyano-11-*N*-methylmoloka'iamina y el kuchinoenamina<sup>47</sup> mostrados en la Figura 26, presentan actividad antibacteriana:

<sup>47</sup> Matsunaga, S.; Kobayashi, H.; Soest, R. W. M. Van; Fusetani, N. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1893–1896.





**Figura 26.** Compuestos antibacterianos aislados de la *Hexadella* sp.

Al igual que la mayoría de compuestos del orden Verongida, en las referencias bibliográficas de las esponjas del género *Hexadella* siguen predominando los compuestos bromados sobre anillos aromáticos. Todos ellos presentan algún tipo de actividad biológica y muchos de ellos fueron sintetizados a lo largo de los últimos años.

Debido a la dificultad de clasificar taxonómicamente a las esponjas del orden Verongida, apenas encontramos una decena de compuestos procedentes del género *Hexadella indica*, lo que resalta la importancia del aislamiento de nuevos compuestos de estas esponjas con el fin de usarlos como marcadores quimiotaxonómicos.

2.2. *Hexadella sp. cf Hexadella indica*

2.2.1 Identificación y clasificación

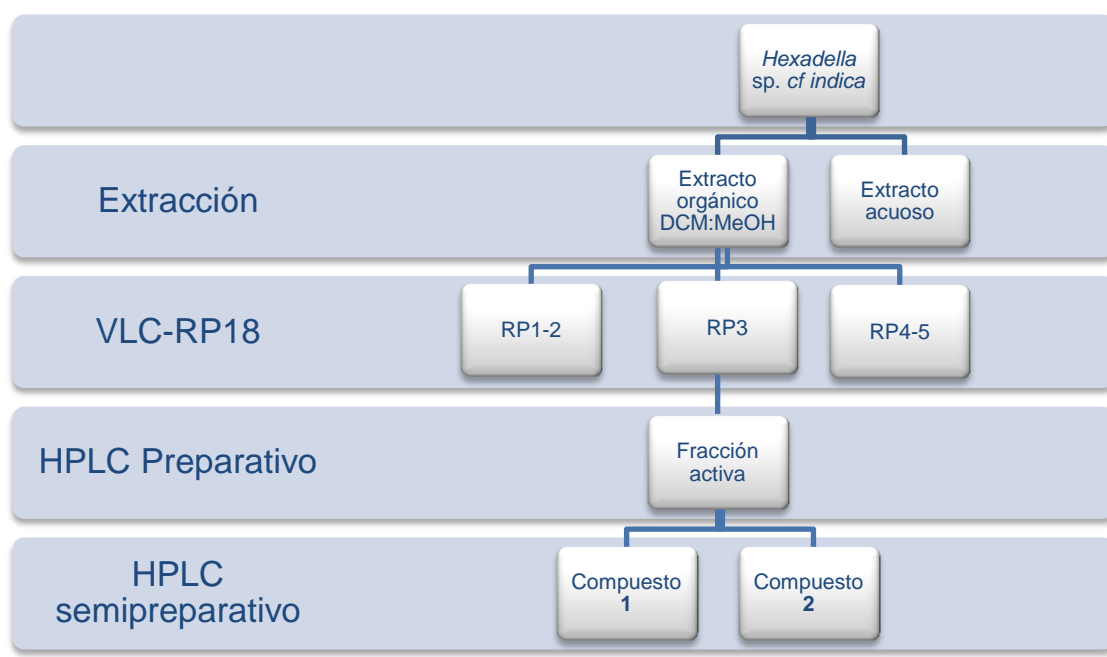


Figura 27. Fotografía de la esponja *Hexadella sp. cf indica*.

Durante la expedición científica organizada por PharmaMar en Sanguie (Indonesia), en mayo de 2010, se recolectó la esponja *Hexadella sp. cf Hexadella indica* en la isla de Para (125° 30.496' E 03° 03.603'N) mediante el uso del sistema de buceo rebreather en profundidad. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por la Dra. Maria Jesús Uriz Lespe del Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Esta muestra se codificó con el código ORMA090313 y el estudio preliminar de citotoxicidad resultó positivo, por lo que 47 de los 62 g recolectados se estudiaron con el fin de obtener nuevos metabolitos con actividad citotóxica.

### 2.2.2. Extracción y fraccionamiento

La muestra se sometió al procedimiento ya descrito en el Capítulo 1, donde la fracción metanólica obtenida mediante VLC-RP, con un peso en seco de 565 mg, se separó mediante HPLC preparativo en fase reversa, concentrándose la actividad en la fracción RP3. Esta fracción se purificó mediante HPLC semipreparativo, obteniéndose 17.6 mg del compuesto **1** y 6.7 mg del compuesto **2**. Todo el proceso de aislamiento se resume en el Esquema 3.



Esquema 3. Extracción y fraccionamiento del extracto orgánico de la esponja *Hexadella sp. cf. indica*.

Todas las etapas se sometieron a un fraccionamiento bio guiado mediante el estudio de su actividad citotóxica en un panel de tres líneas celulares tumorales: A-549 (pulmón), HT-29 (colon) y MDA-MB-231 (mama). Aquellas fracciones que presentaron actividad, se purificaron dando lugar al aislamiento de dos compuestos puros (**1** y **2**) que no desreplicaron en nuestra base de datos, deduciéndose, por tanto, que se trataban probablemente de dos nuevos compuestos. Durante todo el proceso, las fracciones activas se estudiaron por espectrometría de masas como se indica en el capítulo 3.

## 2.2.3 Determinación estructural

### 2.2.3.1. Anomian B (1)

Se obtuvo como un sólido incoloro amorfo con una rotación óptica específica de  $[\alpha]_D +10.5^\circ$  (c 0.1, MeOH). El espectro de infrarrojo de **1** presentó una banda a  $1673\text{ cm}^{-1}$ , sugiriendo la presencia de un grupo amida, mientras que el espectro de ultravioleta-visible mostró máximos de absorción a  $\lambda_{\text{max}}$  276 y 284 nm, indicando la existencia de un posible sistema bencénico sustituido.

La elucidación estructural se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de alta y baja resolución, y espectroscopia de RMN mono y bidimensional. En el espectro de masas de alta resolución (+)-HRESITOFMS (Figura 28) se observó un ión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  739.9338 correspondiente a una fórmula molecular  $C_{25}H_{34}^{79}\text{Br}_4N_3O_3$  (calc. para  $C_{25}H_{34}^{79}\text{Br}_4N_3O_3$   $m/z$  739.9328  $\Delta m = 0.0010\text{ uma}$ ). En el espectro de masas de baja resolución dicho ión se detectó con una  $m/z$  740, 742, 744, 746 y 748 con una relación isotópica 1:4:6:4:1, característica para un compuesto con cuatro átomos de bromo.

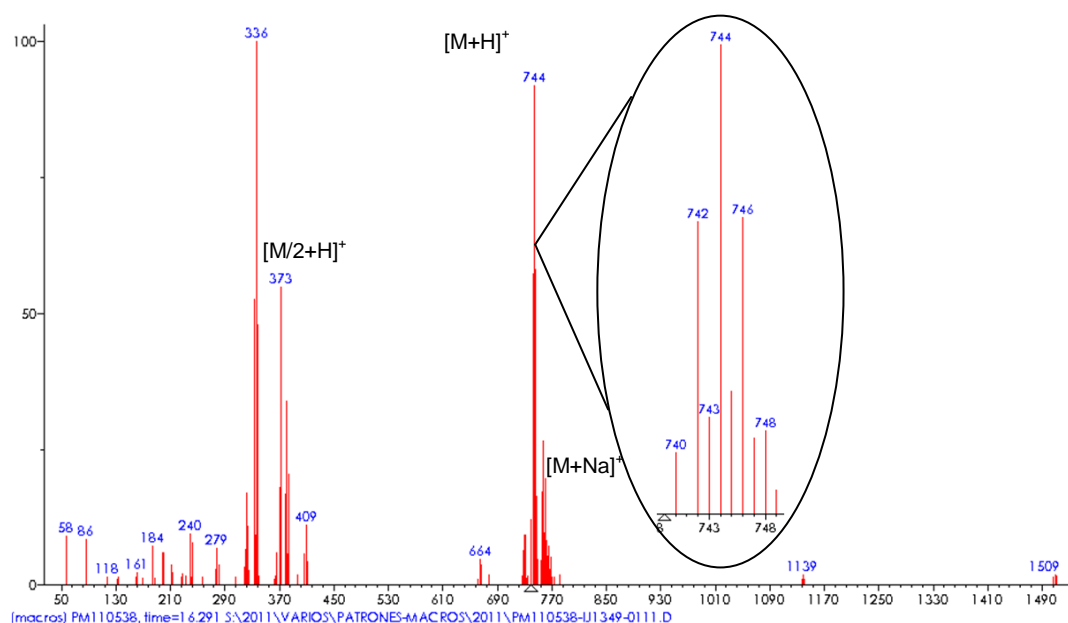


Figura 28. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **1**.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29) y  $^{13}\text{C}$  de **1** (ver Figura 30), junto con el experimento HSQC editado (ver Figura 34), sirvieron para determinar la presencia de nueve carbonos  $sp^2$  no protonados ( $\delta_{\text{C}}$  155.1,  $\delta_{\text{C}}$  153.4,  $\delta_{\text{C}}$  135.1,  $\delta_{\text{C}}$  134.5, dos carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  119.4, dos a  $\delta_{\text{C}}$  119.3 y  $\delta_{\text{C}}$  167.2) siendo uno de ellos el correspondiente a un grupo amida ( $\delta_{\text{C}}$  167.2), cuatro grupos metinos  $sp^2$  (dos carbonos a  $\delta_{\text{H}}$  7.51 /  $\delta_{\text{C}}$  135.2 y dos a  $\delta_{\text{H}}$  7.57 /  $\delta_{\text{C}}$  134.4), seis grupos metilenos  $sp^3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.87;3.75 /  $\delta_{\text{C}}$  71.6,  $\delta_{\text{H}}$  3.33 /  $\delta_{\text{C}}$  59.1,  $\delta_{\text{H}}$  3.51;3.28 /  $\delta_{\text{C}}$  38.0,  $\delta_{\text{H}}$  3.36;3.00 /  $\delta_{\text{C}}$  34.3,  $\delta_{\text{H}}$  1.84;1.70 /  $\delta_{\text{C}}$  30.6 y  $\delta_{\text{H}}$  2.99 /  $\delta_{\text{C}}$  30.3) y cinco grupos metilos unidos a heteroátomos ( $\delta_{\text{H}}$  3.77 /  $\delta_{\text{C}}$  61.1, dos a  $\delta_{\text{H}}$  2.93 /  $\delta_{\text{C}}$  43.6 y dos a  $\delta_{\text{H}}$  2.99 /  $\delta_{\text{C}}$  42.5). Todos estos desplazamientos se recogen en la Tabla 4.

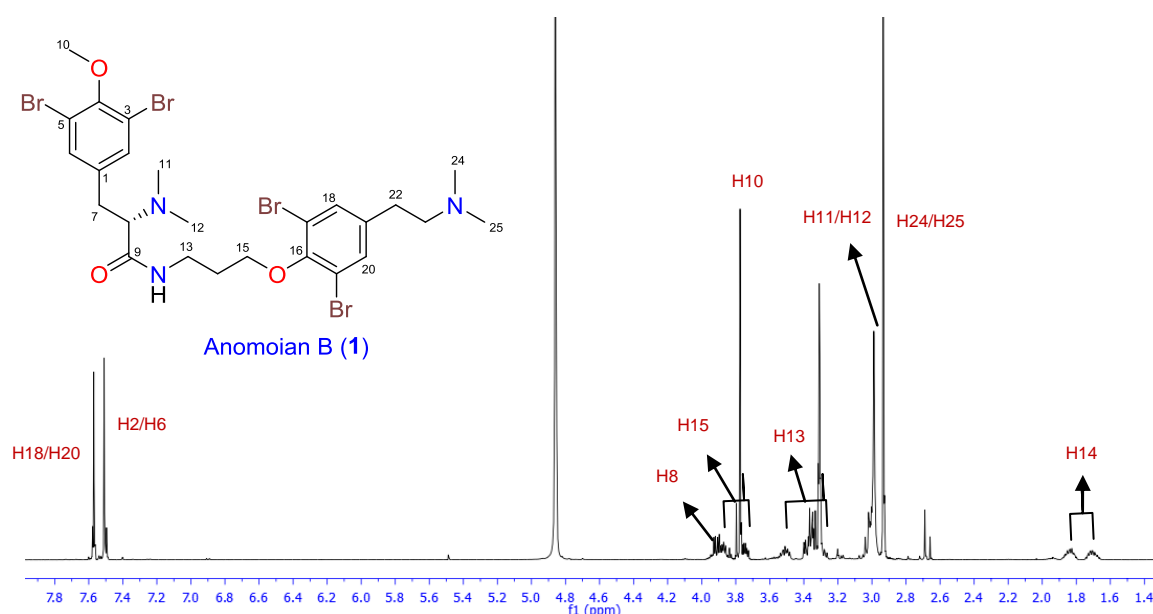


Figura 29. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **1**.

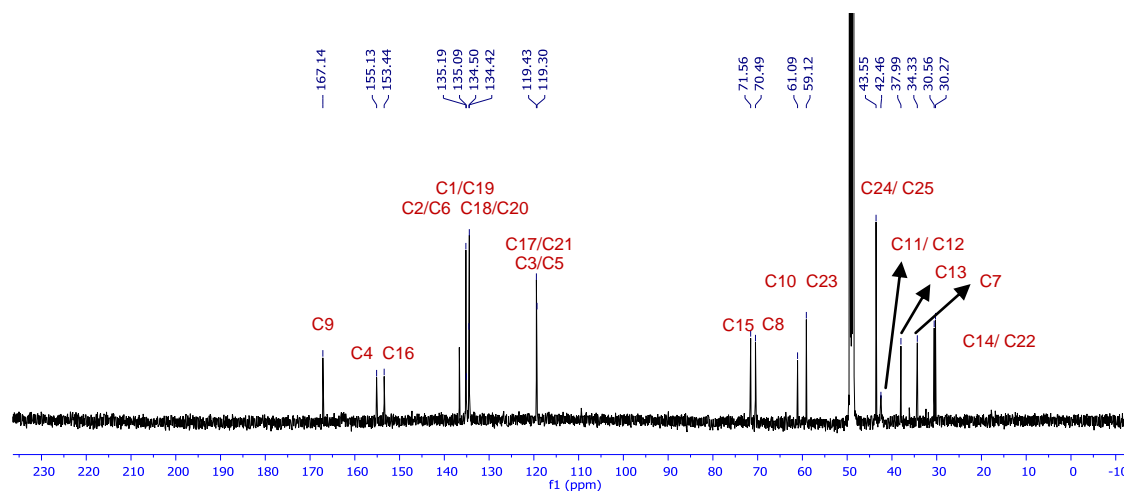
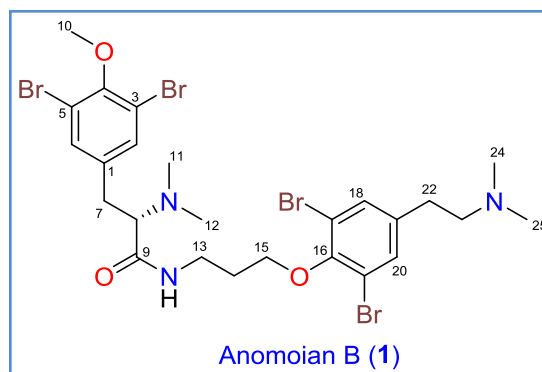


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **1**.

**Tabla 4.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de anomoian B (1) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz)
1	134.5, C	
2	135.2, CH	7.51, s
3	119.3, C	
4	155.1, C	
5	119.3, C	
6	135.2, CH	7.51, s
7	34.3 $\text{CH}_2$	3.36, m 3.00, m
8	70.5, CH	3.91, dd (11.2, 4.6)
9	167.2, C	
10	61.1, $\text{CH}_3$	3.77, s
11	42.5, $\text{CH}_3$	2.99, s
12	42.5, $\text{CH}_3$	2.99, s
13	38.0, $\text{CH}_2$	3.51, m 3.28, m
14	30.6, $\text{CH}_2$	1.84, m 1.70, m
15	71.6, $\text{CH}_2$	3.87, m 3.75, m
16	153.4, C	
17	119.4, C	
18	134.4, CH	7.57, s
19	135.1, C	
20	134.4, CH	7.57, s
21	119.4, C	
22	30.3, $\text{CH}_2$	2.99, m
23	59.1, $\text{CH}_2$	3.33, m
24	43.6, $\text{CH}_3$	2.93, s
25	43.6, $\text{CH}_3$	2.93, s

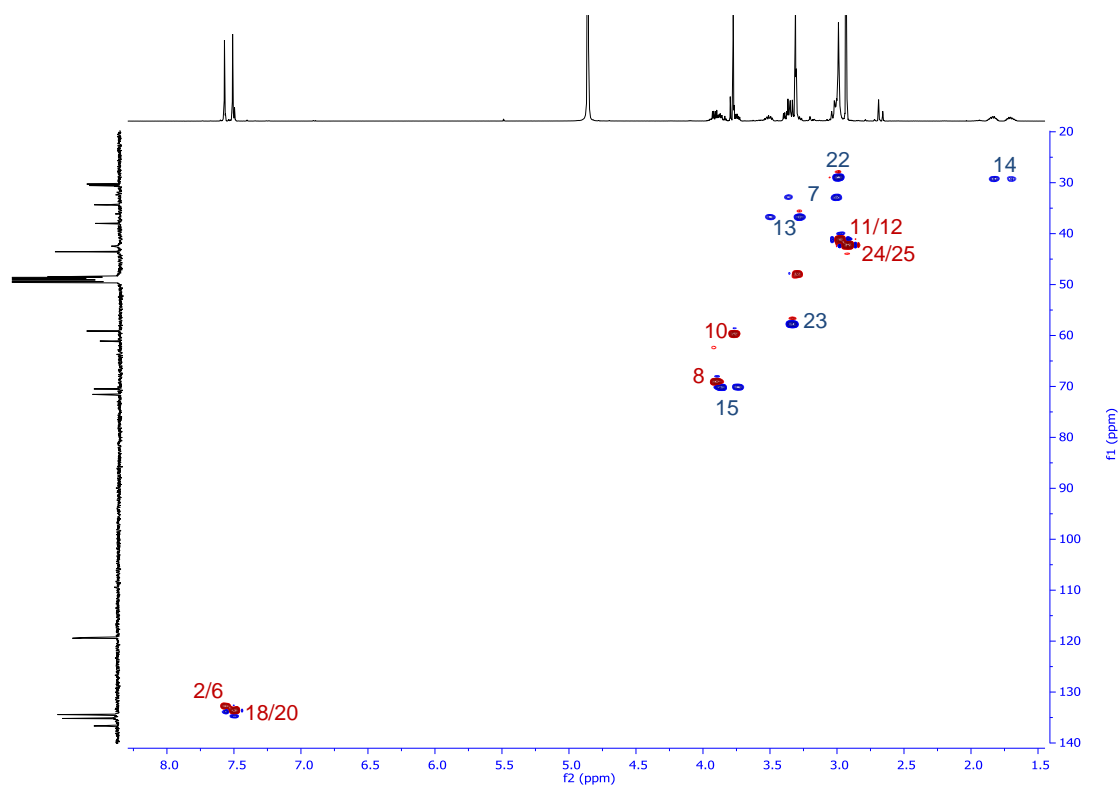
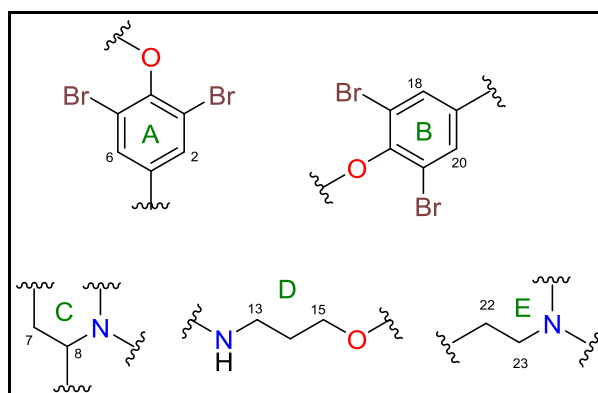


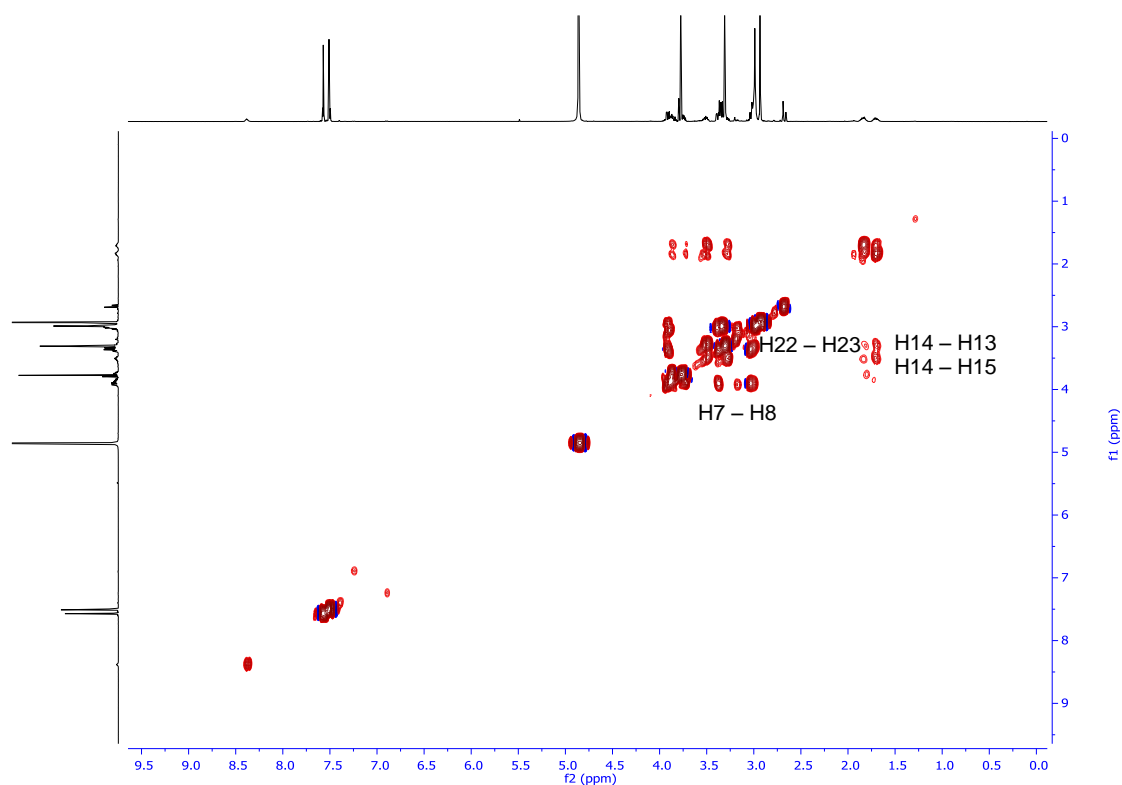
Figura 31. Espectro HSQC-Editado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 1.

Los dos singletes a  $\delta_{\text{H}}$  7.51 y 7.57, cuyas señales integraban por dos protones, observados en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1** (ver Figura 29) conjuntamente con el resto de los desplazamientos químicos de protón y carbono, indicó la existencia de dos anillos simétricos 1,3,4,5-tetrasustituídos, un grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.77 /  $\delta_{\text{C}}$  61.1) y cuatro *N*-metilos (2x  $\delta_{\text{H}}$  2.93 /  $\delta_{\text{C}}$  43.6 y 2x  $\delta_{\text{H}}$  2.99 /  $\delta_{\text{C}}$  42.5). Los desplazamientos a  $\delta_{\text{C}}$  155.1 y 153.4 (C4 y C16), característicos de carbonos aromáticos unidos a oxígeno y los 4 átomos de bromo en la molécula detectados en su espectro de masas, indican que los carbonos C3 y C5 ( $\delta_{\text{C}}$  119.3) y C17/C21 ( $\delta_{\text{C}}$  119.4) de los anillos **A** y **B** se corresponden con sistemas 1,2,3,5 sustituidos por dos bromos y un átomo de oxígeno. El análisis del espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 33), reveló la presencia de tres sistemas de espines: **C**  $\rightarrow$  2-aminoetil: C7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.36; 3.00)-C8 ( $\delta_{\text{H}}$  3.91), **D**  $\rightarrow$  3-aminopropanol: C13 ( $\delta_{\text{H}}$  3.51; 3.28)-C14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.84; 1.70)-C15 ( $\delta_{\text{H}}$  3.87; 3.75) y **E**  $\rightarrow$  2-aminoetil: C22 ( $\delta_{\text{H}}$  2.99)-C23 ( $\delta_{\text{H}}$  3.33), obteniéndose 5 fragmentos de la molécula como muestra la Figura 32.

Los desplazamientos químicos de los carbonos C8 ( $\delta_H$  2.99/ $\delta_C$  70.5), C13 ( $\delta_H$  3.51; 3.28/ $\delta_C$  38.0), C15 ( $\delta_H$  3.87; 3.75/ $\delta_C$  71.6) y C23 ( $\delta_H$  3.33/ $\delta_C$  59.1) indican que estos carbonos están enlazados a heteroátomos.



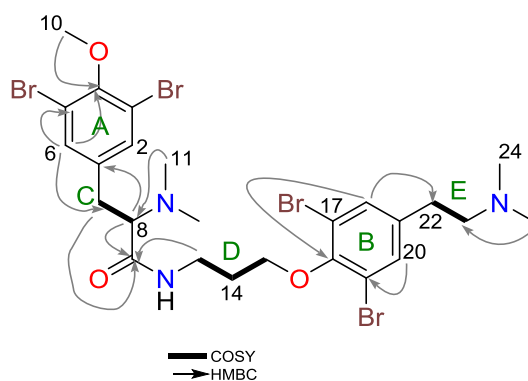
**Figura 32.** Sistemas de espín deducidos de los experimentos RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC-Editado y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto 1.



**Figura 33.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 1.



Las señales observadas en el experimento HMBC (Figura 35) permitieron identificar a los carbonos correspondientes al anillo **A** (C1-C6) y al anillo **B** (C16-C21). El grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.77 /  $\delta_{\text{C}}$  61.1) se colocó en el residuo de dibromotirosina **A** ya que se observó una correlación a larga distancia con el carbono a  $\delta_{\text{C}}$  155.1 (C4). La correlación observada entre H2/H6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.51) con C7 ( $\delta_{\text{C}}$  34.3) y H8 ( $\delta_{\text{H}}$  3.91) con C1 ( $\delta_{\text{C}}$  134.5) nos permitió unir los sistemas **A** y **C**, e identificar una unidad *N,N'*-dimetilamino-4-metoxi-3,5-dibromotirosina. Por su parte, la correlación observada entre H18 ( $\delta_{\text{H}}$  7.57) y C22 ( $\delta_{\text{C}}$  30.3), permitió conectar los sistemas **B** y **E**, completando el fragmento como una unidad de *N,N'*-dimetilamino-3,5-dibromotiramina. La unión de los sistemas de espín **C**, **D**, se dedujo a través de correlaciones HMBC de la señal del carbono de la amida en C9 a  $\delta_{\text{C}}$  167.2 con los protones H13 ( $\delta_{\text{H}}$  3.51) y H7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.36). Finalmente, las correlaciones entre los protones  $\delta_{\text{H}}$  2.99 (s, 6H) y  $\delta_{\text{H}}$  2.93 (s, 6H) con C8 ( $\delta_{\text{C}}$  70.5) y C23 ( $\delta_{\text{C}}$  59.1) permitieron situar los dos grupos *N*-dimetil sobre los carbonos C8 y C25 respectivamente (Ver Figura 34). Por lo tanto, la única opción para unir ambos fragmentos, fue a través de la funcionalidad éter que conecta los fragmentos **D** y **B**.



**Figura 34.** Correlaciones observadas en los experimentos COSY y HMBC del compuesto **1**.

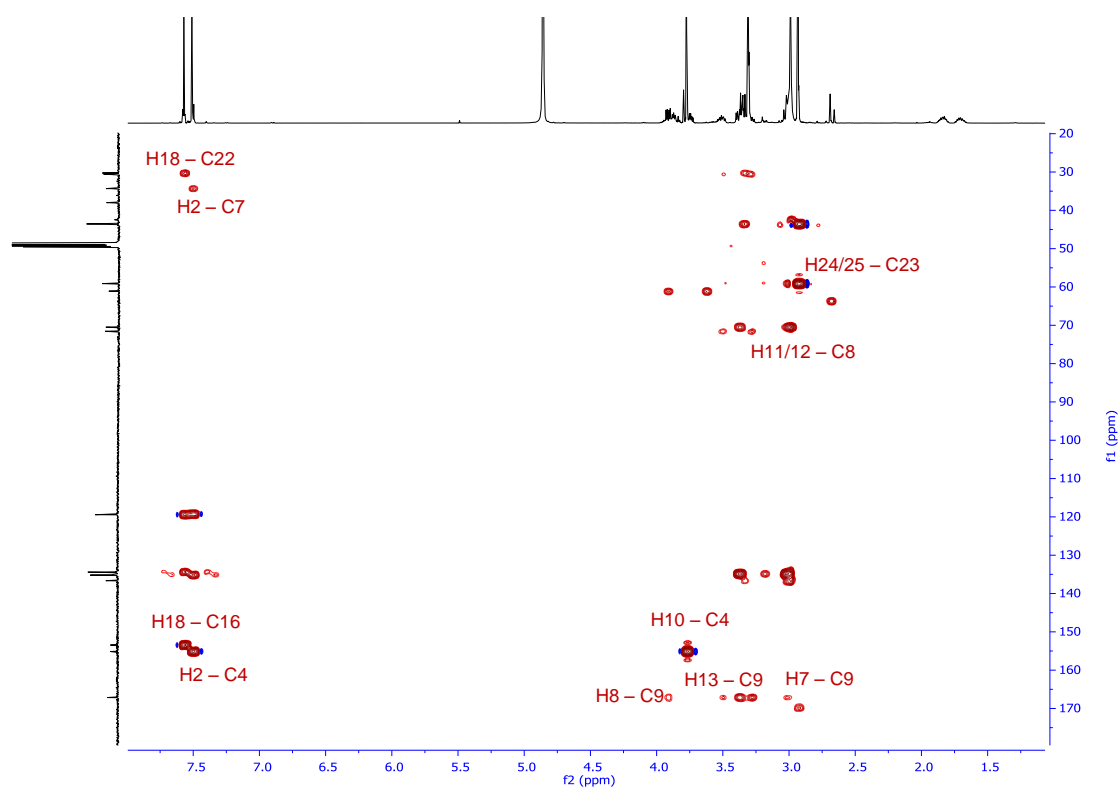


Figura 35. Espectro HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 1.

Las correlaciones observadas en el experimento HMBC de **1** (Figura 35), se recogen a modo de resumen en la Figura 36, donde se indican las señales observadas entre los protones del compuesto **1** y sus carbonos cercanos:

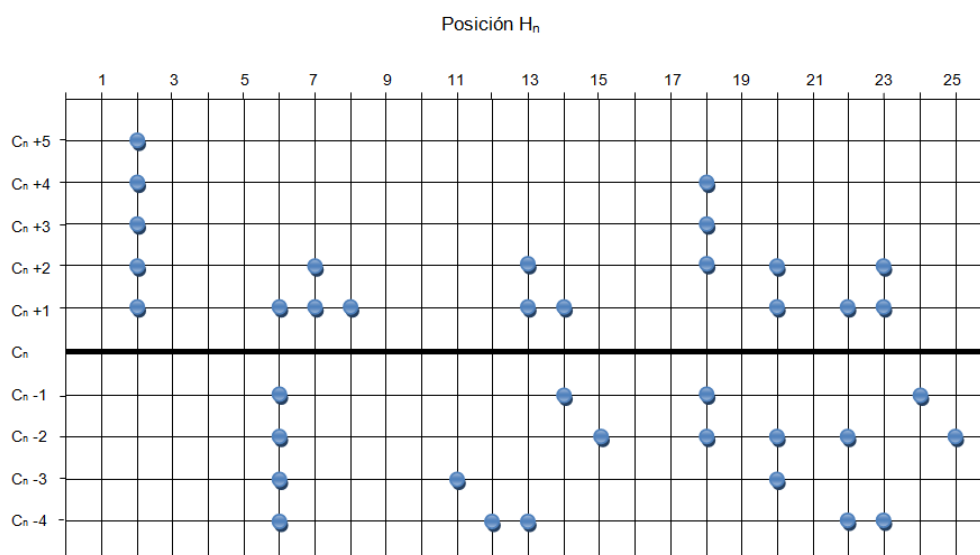


Figura 36. Correlaciones HMBC del compuesto 1.

El experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY de **1** confirmó que los sistemas **A**, **C** y **B**, **E**, estaban conectados (ver Figura 37 y Figura 38). La conexión de los sistemas de espín **A** y **C** se confirmó con el experimento de RMN gHMBC y las correlaciones rOe observadas entre H2/H6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.51) con H7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.36; 3.00) y H2/H6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.51) con H8 ( $\delta_{\text{H}}$  3.91). De igual forma, las correlaciones rOe observadas entre H18/H20 ( $\delta_{\text{H}}$  7.57) con H22 ( $\delta_{\text{H}}$  2.99) corroboraron la conexión de los espines **B** y **E**.

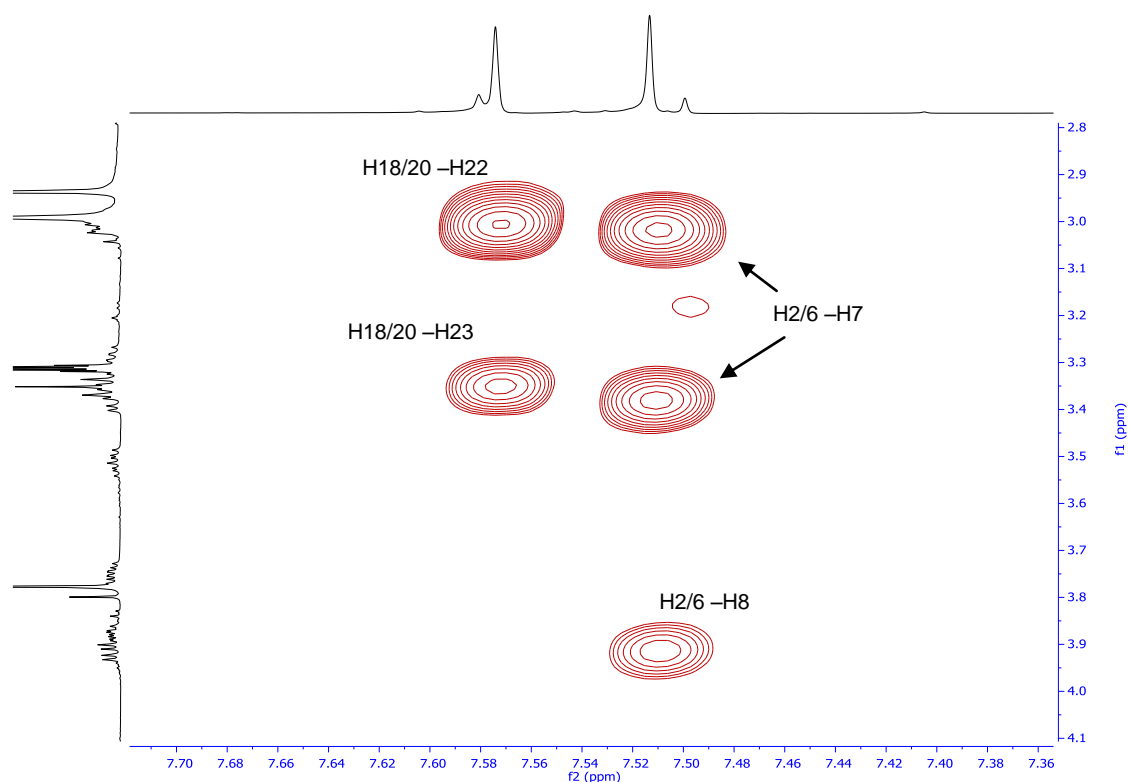


Figura 37. Ampliación de las correlaciones clave del experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY del compuesto **1**.

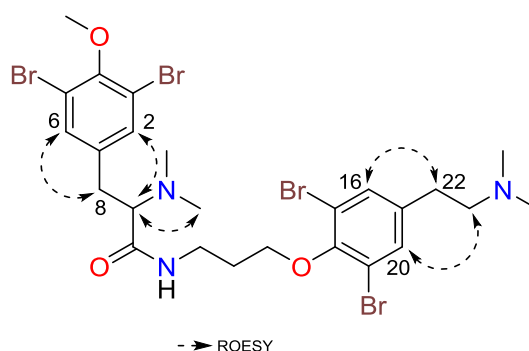


Figura 38. Correlaciones seleccionadas del experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY del compuesto **1**.

Debido a la similitud encontrada en los desplazamientos químicos de RMN de los dos fragmentos de bromotirosina presentes en el compuesto **1**, se estudió en profundidad su espectro de masas MS/MS con el fin de identificarlos y determinar su posición estructural. La fragmentación selectiva del ión  $[M+H]^+$  indicó la pérdida del fragmento de dibromometoxitirosina presente en **1** (ver Figura 39).

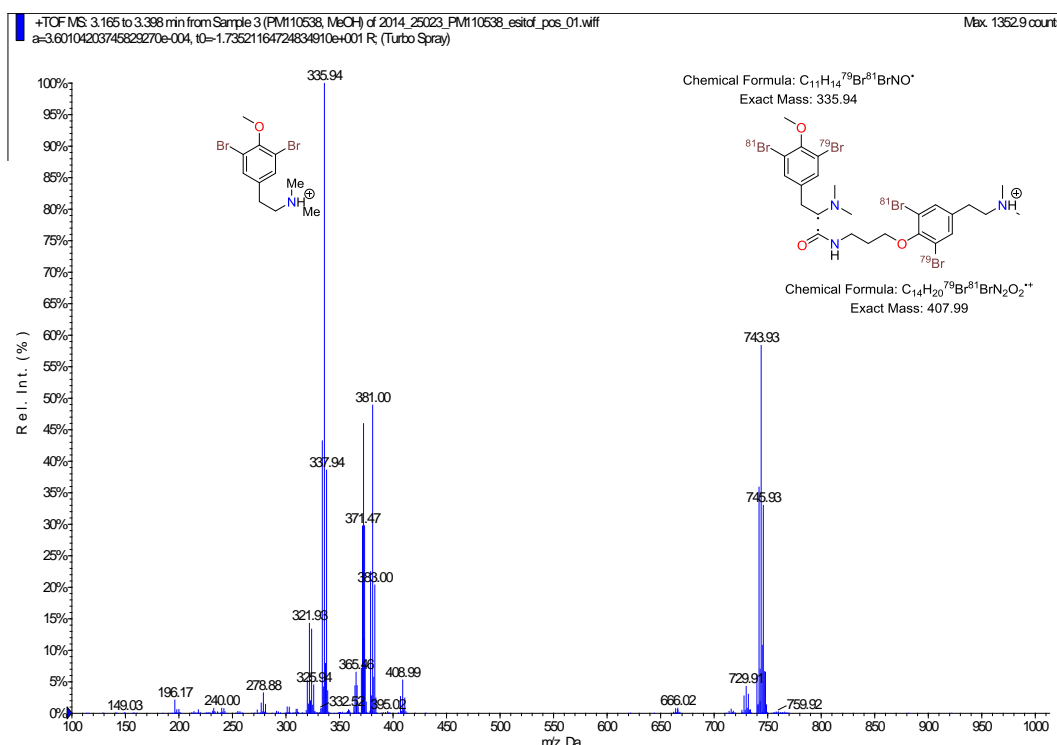


Figura 39. Espectro de MS/MS del compuesto **1**.

La selección de iones  $[M+H]^+$  a  $m/z$  739.93 en el experimento MS/MS de **1**, que contiene los cuatro isótopos de  $^{79}Br$ , y a  $m/z$  743.92, que contiene dos isótopos  $^{79}Br$  y otros dos  $^{81}Br$ , dio lugar a los fragmentos de  $m/z$  333.94 y  $m/z$  335.94 respectivamente, correspondiente a la pérdida de la unidad de dibromometoxitirosina **A-C** (ver Figura 40, Figura 41 y Figura 42).

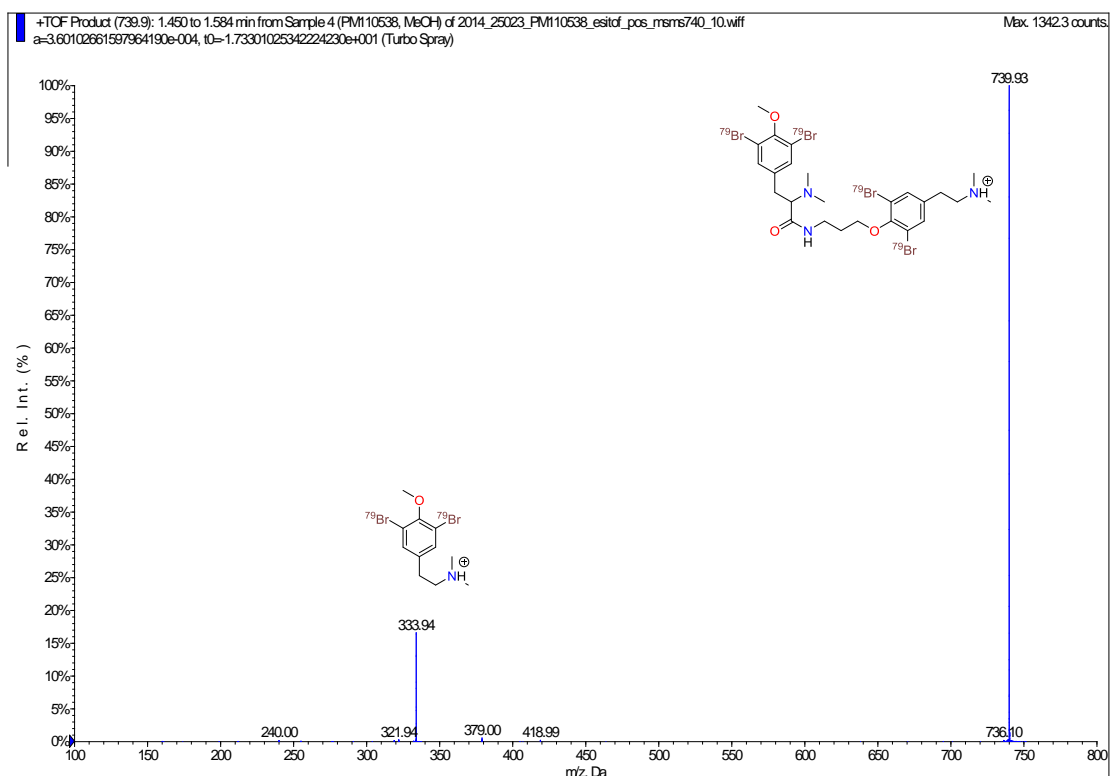


Figura 40. Fragmentación MS/MS en alta resolución a  $m/z$  del ión  $[M+H]^+$  ( $^{79}\text{Br}_4$ ) 739.93 del compuesto 1.

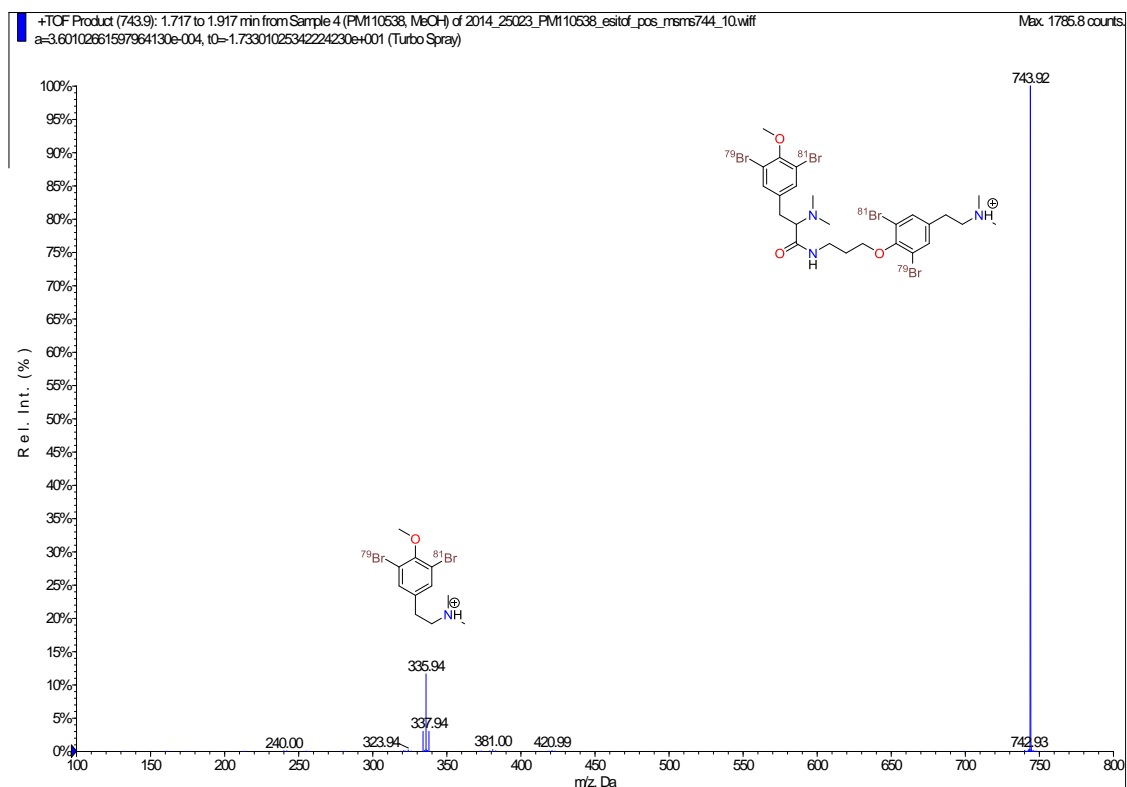
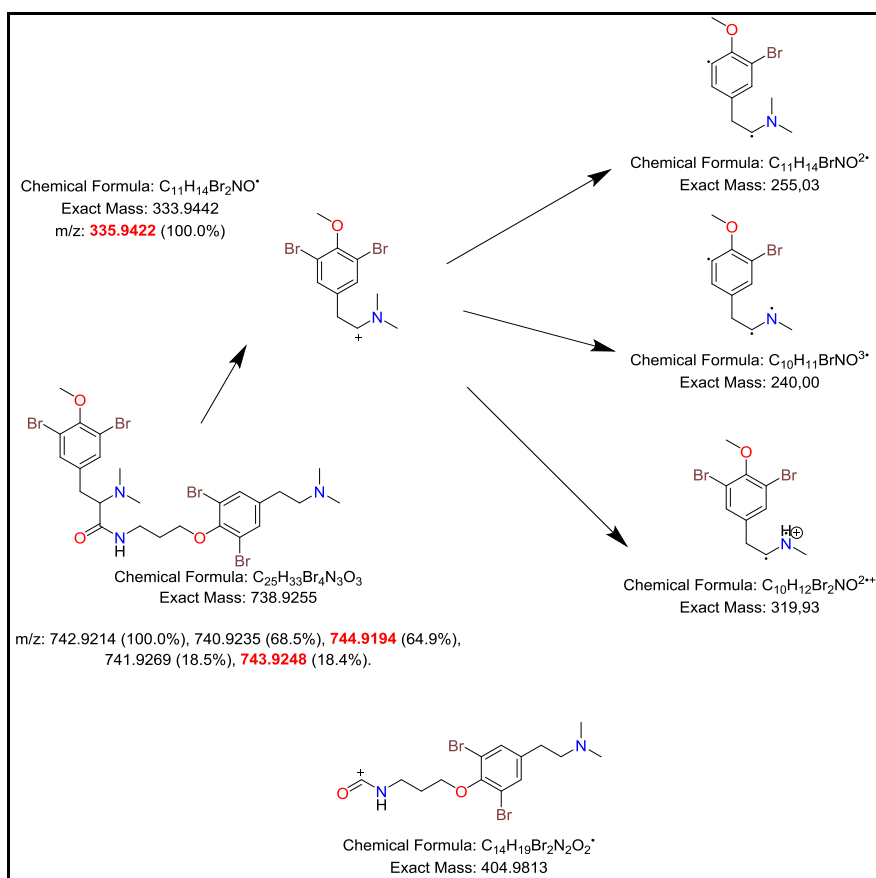


Figura 41. Fragmentación MS/MS en alta resolución del ión  $[M+H]^+$  ( $^{79}\text{Br}_2\ ^{81}\text{Br}_2$ ) a  $m/z$  743.92 del compuesto 1.

Una vez analizadas las masas del espectro de los picos observados, se identificaron los siguientes fragmentos, confirmando la estructura del compuesto **1**, propuesta por el estudio de su RMN:



**Figura 42.** Fragmentos del compuesto **1** deducidos de la fragmentación selectiva MS/MS en modo alta resolución.

Todos estos datos espectroscópicos confirmaron que el compuesto **1** se trata de una molécula no descrita previamente en la bibliografía, a la que hemos denominado anomoian B, por la similitud con el compuesto ya conocido anomoian A<sup>48</sup> (Figura 43). El fragmento de bromotirosina-3-aminopropanol-tiramina, presente en su estructura, ya se ha descrito anteriormente en compuestos similares tales como las purpureaminas.<sup>49</sup>

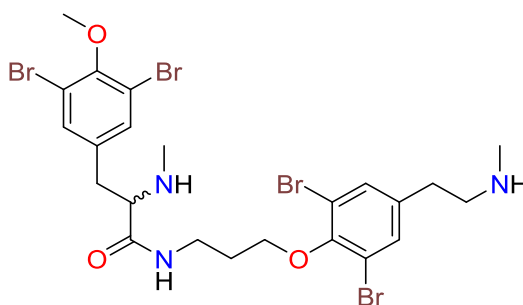


Figura 43. Estructura de anomoian A (**1**).

La determinación de la estereoquímica en C8 del compuesto **1** se realizó por comparación de su valor de  $[\alpha]_D$  de  $+10.5^\circ$  con el de algunos de los análogos descritos de este compuesto, como el *iso*-anomoian con  $+14.5^\circ$  y la suberedamina A<sup>50</sup>  $+19.5^\circ$  (Figura 44), que contenían un residuo de L-tirosina, responsable de la quiralidad de estas moléculas.

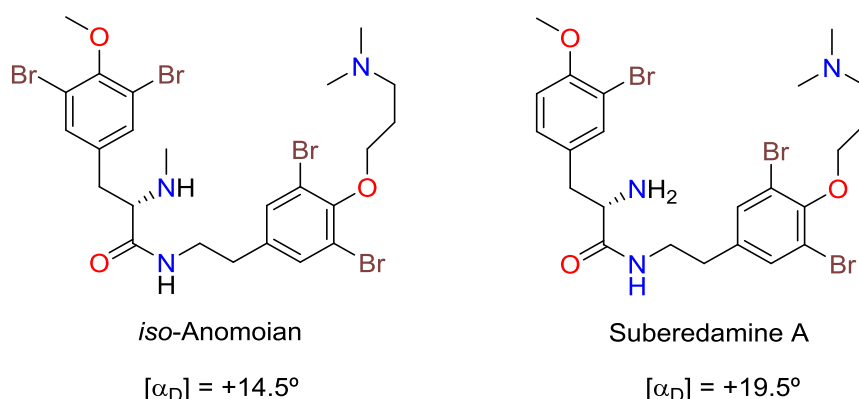


Figura 44. Estructuras de compuestos con la misma estereoquímica que el compuesto **1**.

<sup>48</sup> Kottakota, S. K.; Evangelopoulos, D.; Alnimr, A.; Bhakta, S.; McHugh, T. D.; Gray, M.; Groundwater, P. W.; Marrs, E. C. L.; Perry, J. D.; Spilling, C. D.; Harburn, J. J. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1090–1101.

<sup>49</sup> Dai, J.; Parrish, S. M.; Yoshida, W. Y.; Yip, M. L. R.; Turkson, J.; Kelly, M.; Williams, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 499–504.

<sup>50</sup> Kottakota, S. K.; Evangelopoulos, D.; Alnimr, A.; Bhakta, S.; McHugh, T. D.; Gray, M.; Groundwater, P. W.; Marrs, E. C. L.; Perry, J. D.; Spilling, C. D.; Harburn, J. J. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1090–1101.

Los valores descritos de  $[\alpha]_D$  para estos compuestos, coinciden en signo y rango con el valor obtenido para el compuesto **1**, por lo que se propone que el centro quiral C8 debe tener la configuración 8S. Se añade además el espectro de CD que se muestra en la Figura 45.

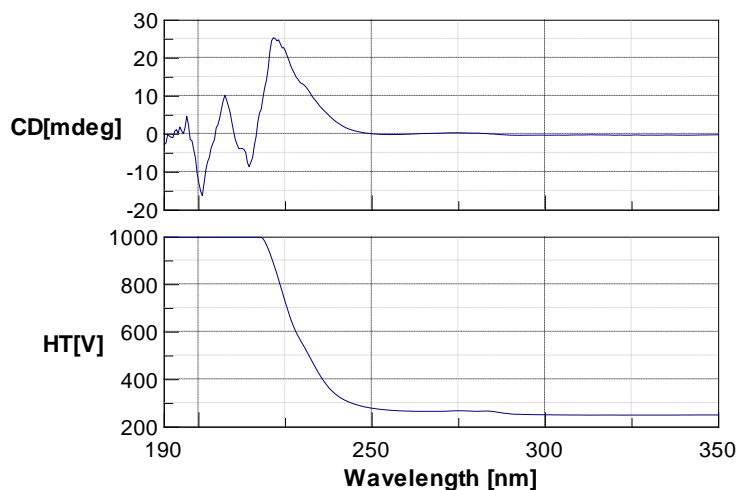


Figura 45. Espectro de CD del compuesto **1**.

El compuesto **1** mostró actividad citotóxica frente a un panel de 3 líneas celulares<sup>51</sup> (A-549 de pulmón, HT-29 de colon y MDA-MB-231 de mama), con un valor de  $GI_{50}$  del orden micromolar (5.0  $\mu$ M, 3.4  $\mu$ M y 4.6  $\mu$ M, respectivamente). Los valores se recogen en la Tabla 5

Tabla 5. Actividad citotóxica del compuesto **1**.

Línea celular	$GI_{50}$ (molar)	TGI (molar)	$LC_{50}$ (molar)
A549	5.0 $\mu$ M	7.0 $\mu$ M	9.6 $\mu$ M
HT-29	3.4 $\mu$ M	4.4 $\mu$ M	6.6 $\mu$ M
MDA-MB-231	4.6 $\mu$ M	7.0 $\mu$ M	9.7 $\mu$ M

El estudio del mecanismo de acción del compuesto **1** se tratará conjuntamente con el del compuesto **3** en el apartado 3.3 del capítulo siguiente.

<sup>51</sup> Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1112–1116.



2.2.3.2. *Aplysamine 4 (2)*

El compuesto **2** (6.7 mg) se aisló como un sólido blanquecino y mostró en su espectro de masas LRESI(+) (ver Figura 46) un pico  $[M+H]^+$  a  $m/z$  697 cuya distribución isotópica indicó que la molécula, al igual que el compuesto **1**, contenía cuatro átomos de bromo. Su fórmula molecular se determinó mediante espectrometría de masas de alta resolución (+)-HRESI como  $C_{21}H_{22}^{79}Br_4N_3O_4$  a partir del ion  $[M+H]^+$  a  $m/z$  697.8514 (calc. para  $C_{21}H_{23}^{79}Br_4N_3O_4$ ,  $m/z$  697.8495  $\Delta m = 0.0029$  uma).

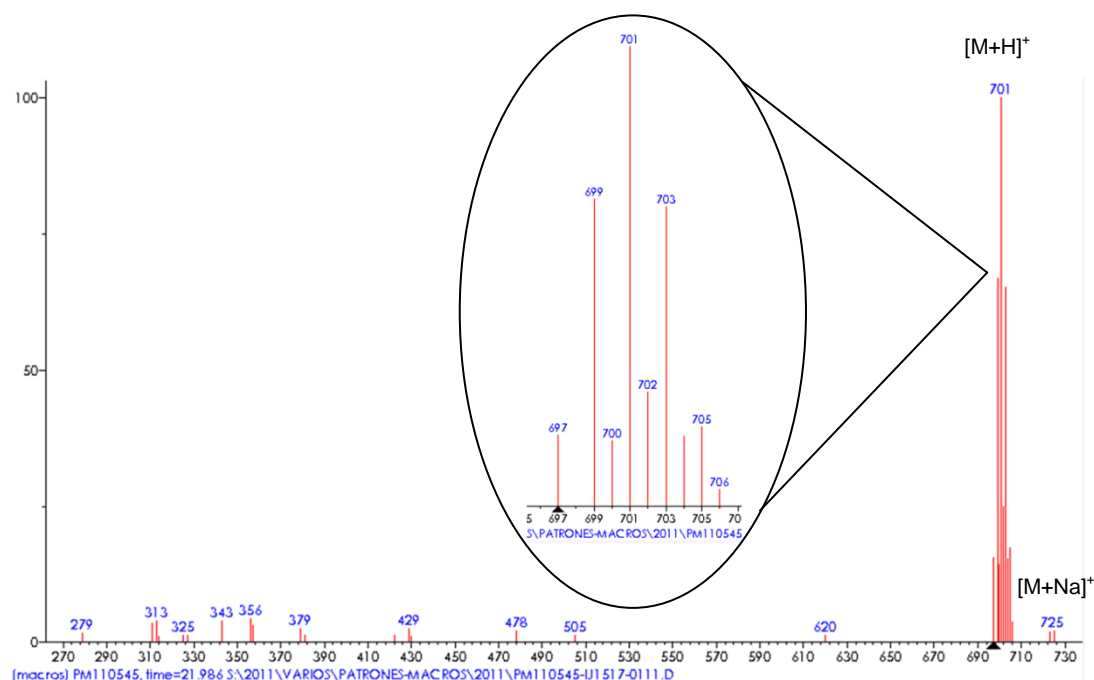


Figura 46. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **2**.

El estudio mediante espectroscopia de RMN confirmó la existencia de 21 carbonos deducidos a partir del espectro de masas de alta resolución. Así, el análisis de RMN de  $^1H$  (ver Figura 47) y  $^{13}C$  (ver Figura 48) y el experimento HSQC editado (Figura 26) del compuesto **2** mostró la presencia de diez carbonos no protonados  $sp^2$  ( $\delta_C$  165.4, 153.8, 152.2, 152.1, 140.3, 137.4, dos carbonos a  $\delta_C$  118.7 y dos a  $\delta_C$  118.6), cuatro grupos metinos aromáticos (dos a  $\delta_H$  7.48/  $\delta_C$  134.5 y dos a  $\delta_H$  7.45/  $\delta_C$  134.4), seis grupos metilenos  $sp^3$  ( $\delta_H$ /  $\delta_C$  4.08/71.6; 3.44/41.4; 3.29/39.0; 2.76/35.2; 2.19/29.0 y 3.82/28.8) y un grupo metoxilo ( $\delta_H$  3.81/  $\delta_C$  61.0). El desplazamiento químico del carbono C9 a  $\delta_C$  165.4 indicó la presencia de un grupo tipo amida.

De los protones aromáticos a  $\delta_H$  7.48 (s) y 7.45 (s) se dedujo que la molécula contenía dos anillos aromáticos simétricos 1,2,3,5-tetrasustituídos (**A** y **B** ver Figura 50).

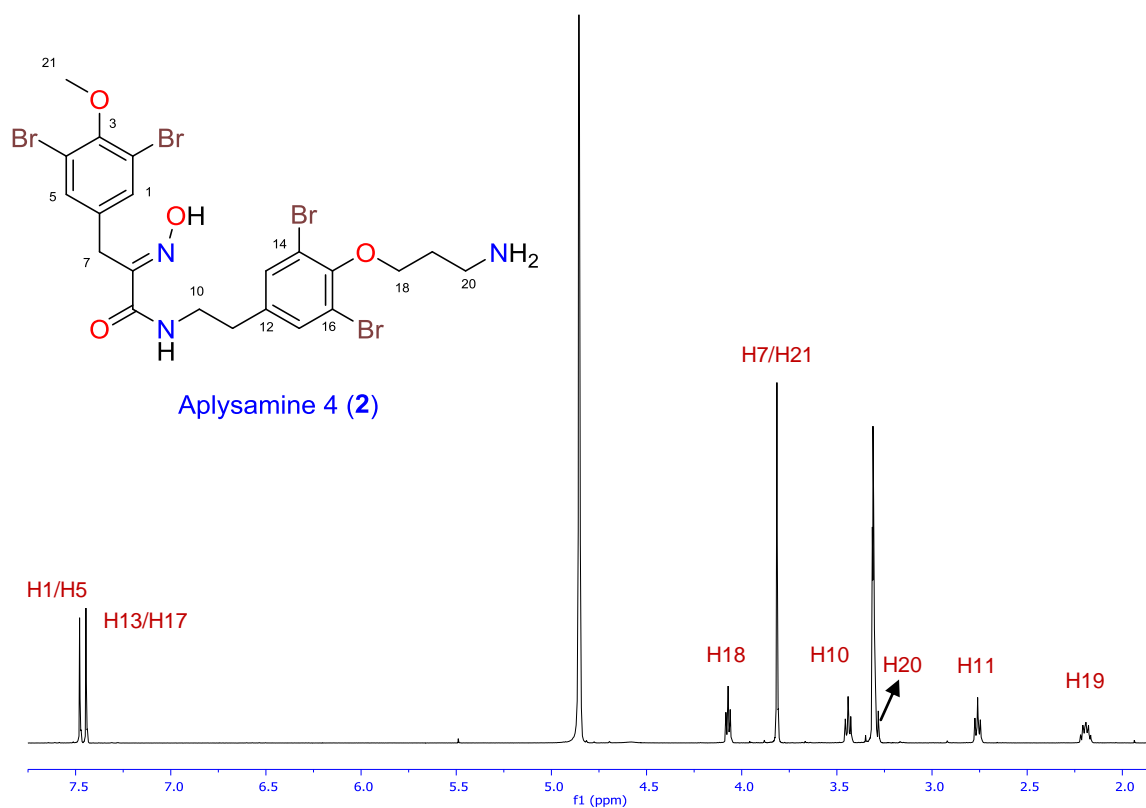


Figura 47. Espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) del compuesto 2.

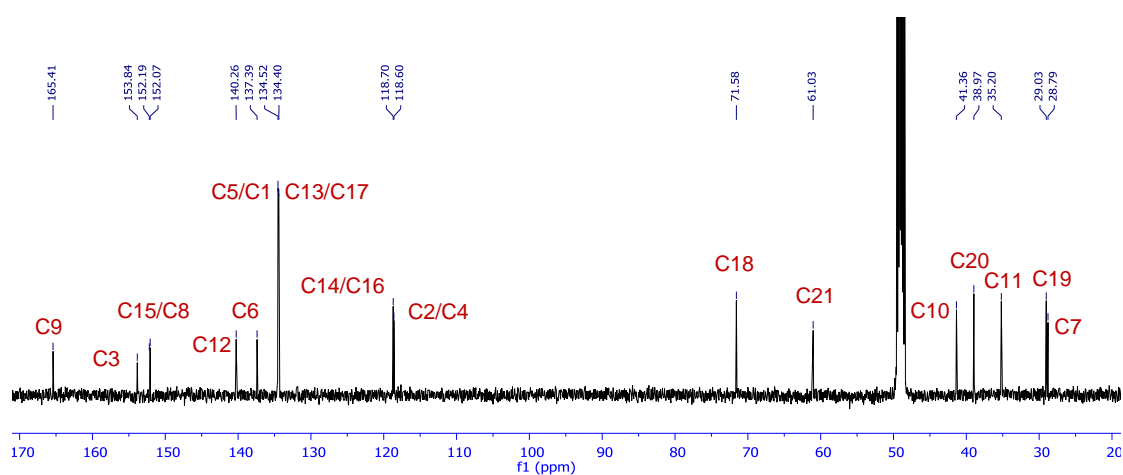
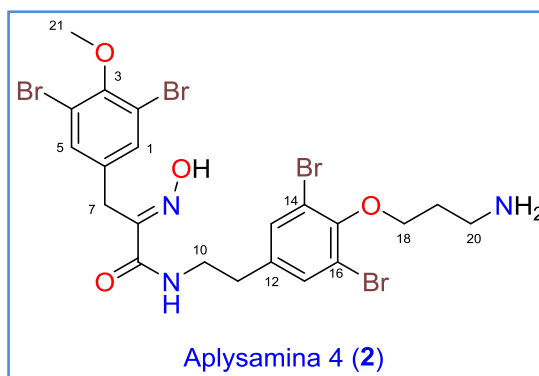


Figura 48. Espectro de RMN de  $^{13}C$  (125 MHz,  $CD_3OD$ ) del compuesto 2.

**Tabla 6.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de aplysamina 4 (**2**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

## Datos experimentales

## Datos bibliográficos

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz)
1	134.5, CH	7.48, s	134.5	7.47
2	118.6, C		118.6	
3	153.8, C		152.1	
4	118.6, C		118.6	
5	134.5, CH	7.48, s	134.5	7.47
6	137.4, C		137.4	
7	28.8, $\text{CH}_2$	3.82, s	28.8	3.81
8	152.1, C		152.2	
9	165.4, C		165.5	
10	41.4, $\text{CH}_2$	3.44, t (7.2)	41.3	3.43
11	35.2, $\text{CH}_2$	2.76, t (7.2)	35.2	2.75
12	140.3, C		140.3	
13	134.4, CH	7.45, s	134.4	7.44
14	118.7, C		118.7	
15	152.2, C		152.1	
16	118.7, C		118.7	
17	134.4, CH	7.45, s	134.4	7.44
18	71.6, $\text{CH}_2$	4.08, t (5.7)	71.6	4.06
19	29.0, $\text{CH}_2$	2.19, m	29.0	2.18
20	39.0, $\text{CH}_2$	3.29, m	39.0	3.29
21	61.0, $\text{CH}_3$	3.81, s	61.0	3.81

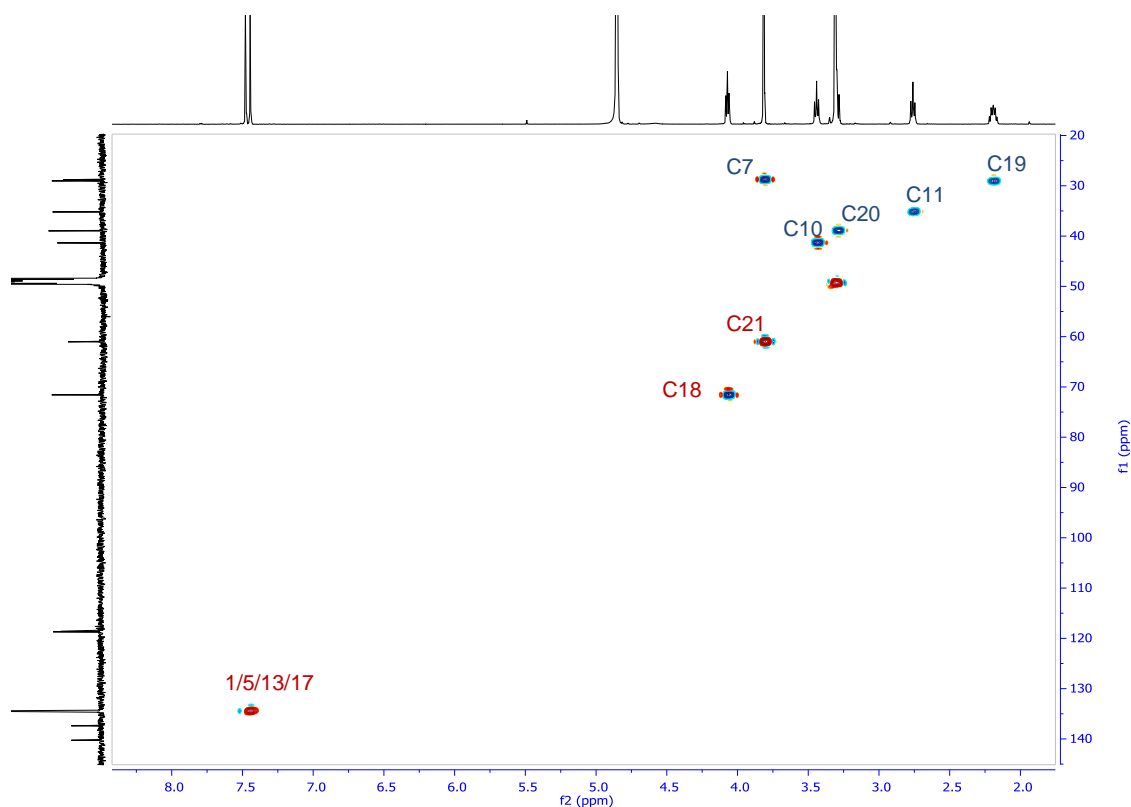
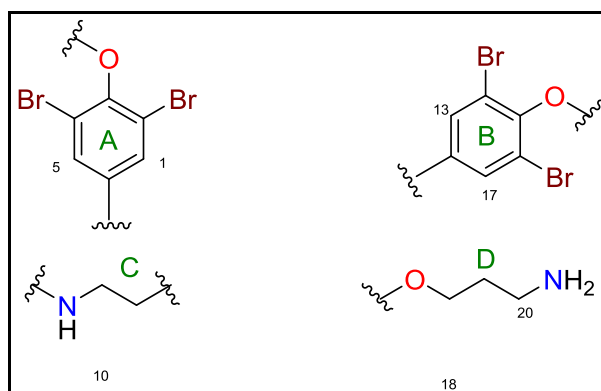


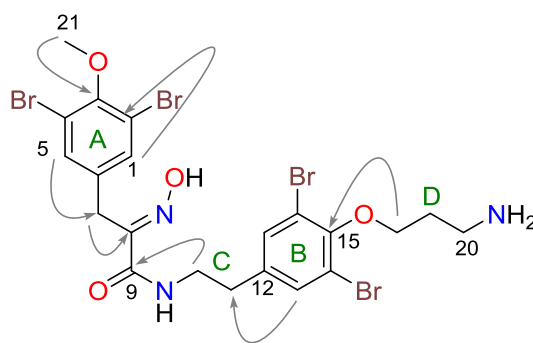
Figura 49. Espectro HSQC-Editado ( $\text{CD}_3\text{OD}$  en 500 MHz) del compuesto **2**.

Mediante el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 51) de **2** se determinaron las señales correspondientes a los sistemas de espín **C**  $\rightarrow$  C10 ( $\delta_{\text{H}}$  3.44)-C11 ( $\delta_{\text{H}}$  2.76), y **D**  $\rightarrow$  C18 ( $\delta_{\text{H}}$  4.08)-C19 ( $\delta_{\text{H}}$  2.19)-C20 ( $\delta_{\text{H}}$  3.29) de la molécula. Los dos anillos aromáticos, junto con estos dos sistemas de espín, se muestran en la Figura 50. Los desplazamientos químicos de C3 y C15 ( $\delta_{\text{C}}$  153.8 y 152.2) son característicos de carbonos bencénicos unidos a oxígeno mientras que la presencia de cuatro átomos de bromo deducidos en el espectro de masas, junto con la presencia de los carbonos cuaternarios en C2 y C4 ( $\delta_{\text{C}}$  118.6) y C14/C16 ( $\delta_{\text{C}}$  118.7) sugieren que los anillos **A** y **B** se corresponden con sistemas 1,3,4,5 tetrasustituídos con dos átomos de bromo, un oxígeno y una cadena carbonada.



**Figura 51.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 2.

El análisis de las correlaciones a larga distancia del experimento HMBC del compuesto **2** (Figura 53) permitió unir los fragmentos **A-D** y llevar a cabo la interconexión de los sistemas de espín deducidos de su espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, así como la conexión entre los carbonos no protonados y el grupo metileno aislado C7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.82/  $\delta_{\text{C}}$  28.8). Las correlaciones más importantes se muestran en la Figura 52, reuniéndose todas las observadas en la Figura 54.



**Figura 52.** Correlaciones HMBC más importantes del compuesto **2**.

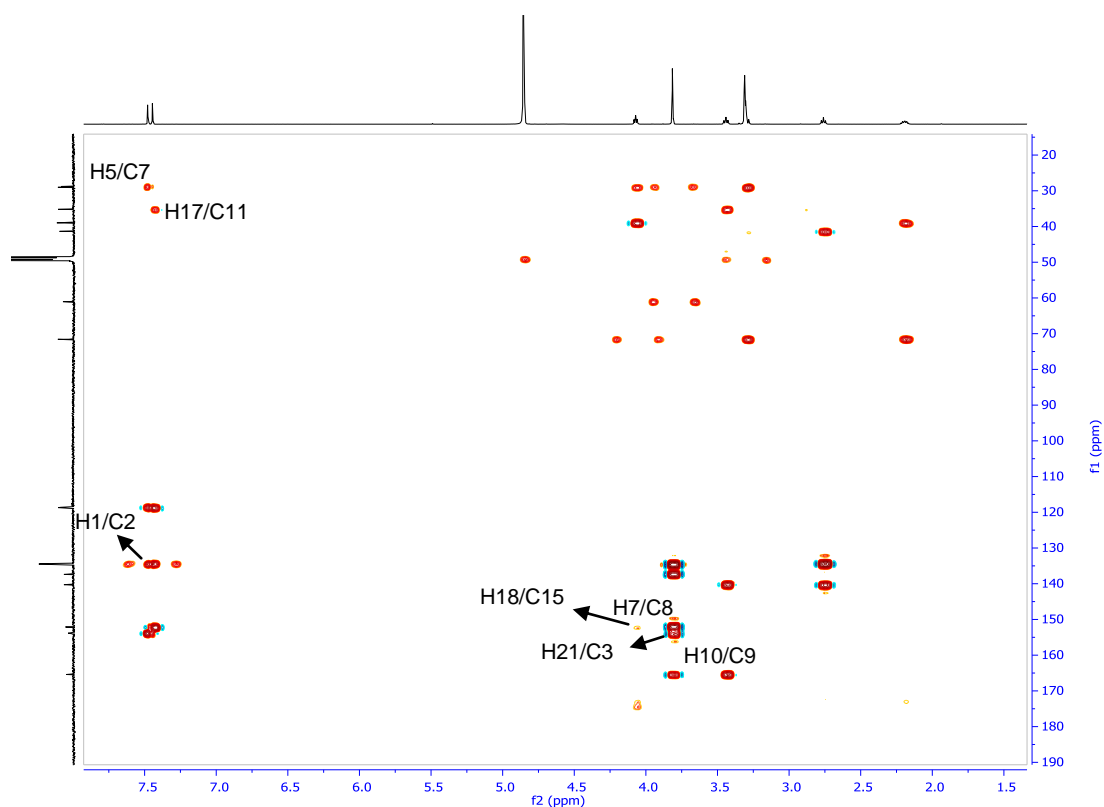


Figura 53. Espectro de RMN de HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 2.

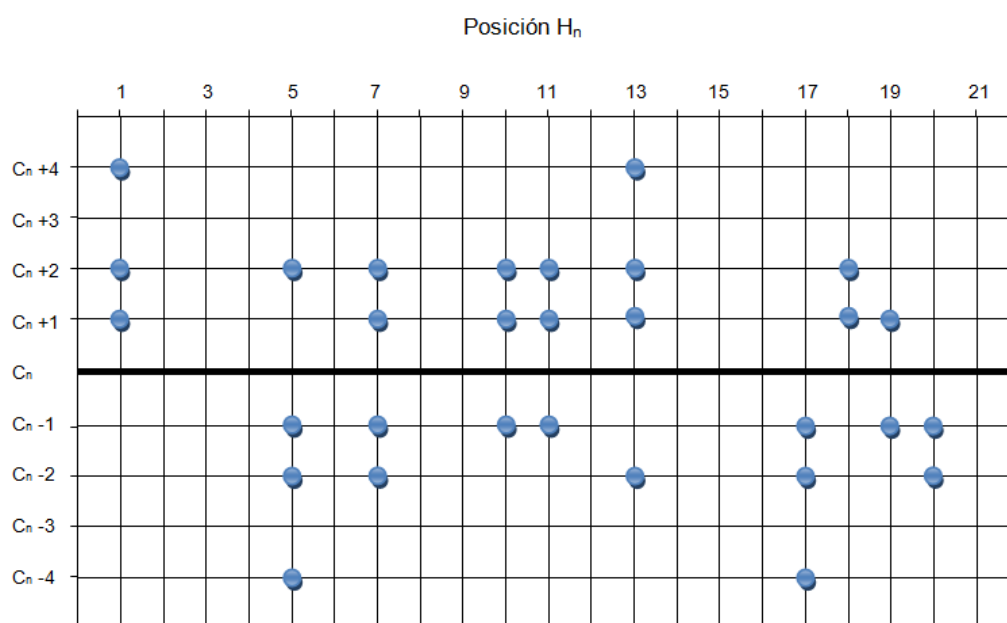


Figura 54. Correlaciones más importantes obtenidas en el HMBC del compuesto 2.

Una búsqueda bibliográfica permitió comprobar que el compuesto **2** había sido descrito previamente por Scheuer y *col.* como aplysamine 4.<sup>52</sup> En la Tabla 6 se puede ver la comparación de los datos de RMN de los dos compuestos y comprobar que los desplazamientos de ambas moléculas son coincidentes.

El compuesto **2** se ensayó frente a un panel de 3 líneas celulares (A-549, HT-29 y MDA-MB-231), dando un valor de GI<sub>50</sub> del orden micromolar (6.8 µM, 14 µM y 12 µM, respectivamente). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 7:

**Tabla 7.** Actividad citotóxica del compuesto 2.

Línea celular	GI <sub>50</sub> (molar)	TGI (molar)	LC <sub>50</sub> (molar)
A549	6.8 µM	>14 µM	>14 µM
HT-29	14 µM	14 µM	>14 µM
MDA-MB-231	12 µM	>14 µM	>14 µM

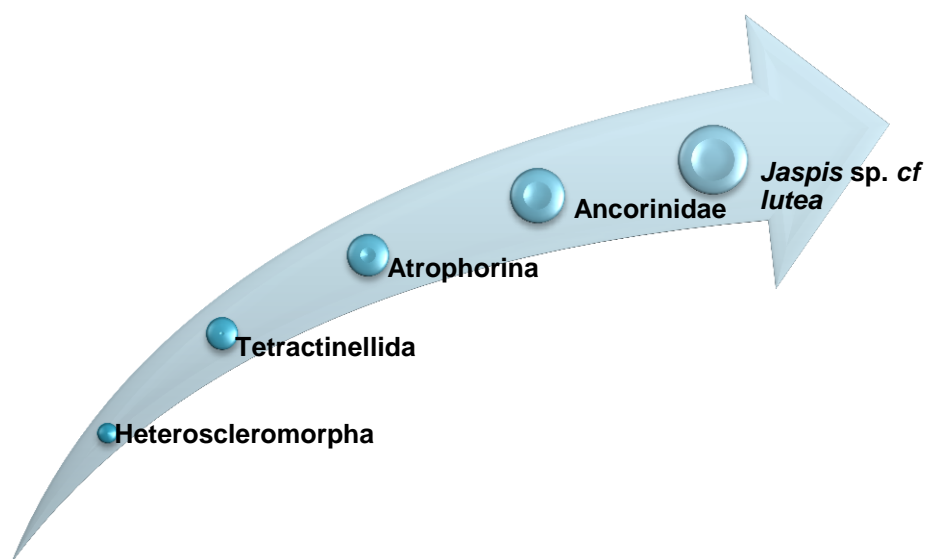
<sup>52</sup> Jurek, J.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1609–1612.



*CAPÍTULO III*  
*JASPIS SP. Y BUBARIS SP.*

### 3. ESTUDIO DE LA ESPONJA JASPIS SP. Y BUBARIS SP.

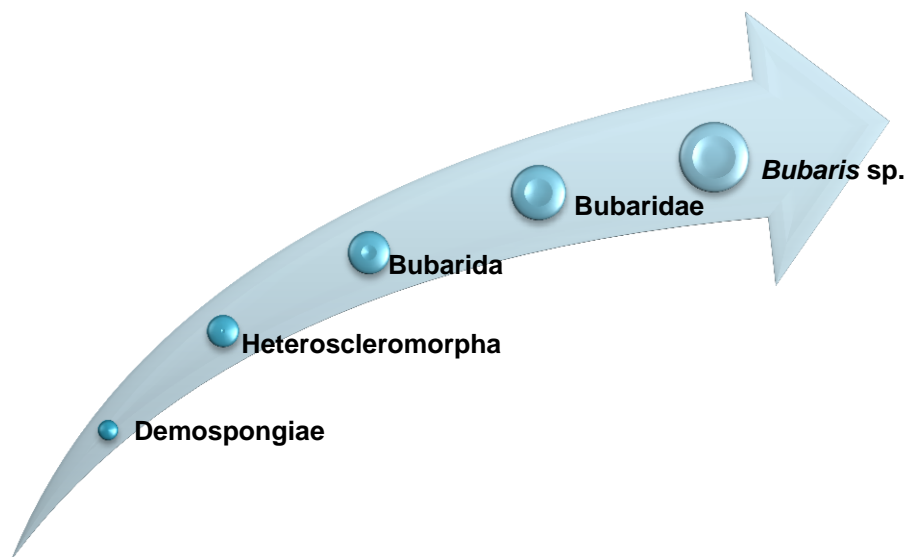
Las esponjas del género *Jaspis* pertenecen a la familia Ancorinidae, suborden Astrophorina, orden Tetractinellida, subclase Heteroscleromorpha, clase Demospongiae, filo Porifera. Son esponjas de crecimiento masivo, con un esqueleto óseo entrelazado irregular. Dentro del género *Jaspis* hay descritas 41 especies diferentes.



**Esquema 4.** Clasificación de las esponjas pertenecientes al género *Jaspis*.

Habitualmente crecen en asociación con otras esponjas, normalmente con esponjas del género *Poecillastra*, donde ambas esponjas crecen conjuntamente como una sola imposible de separar. En esta ocasión, y sin precedentes bibliográficos, la asociación es con una esponja del género *Bubaris*, de la que no han sido aislados compuestos con anterioridad.

Las esponjas del género *Bubaris*, pertenecen a la familia Bubaridae, del orden Bubarida, perteneciente a la subclase Heteroscleromorpha, al igual que las esponjas del género *Jaspis*.



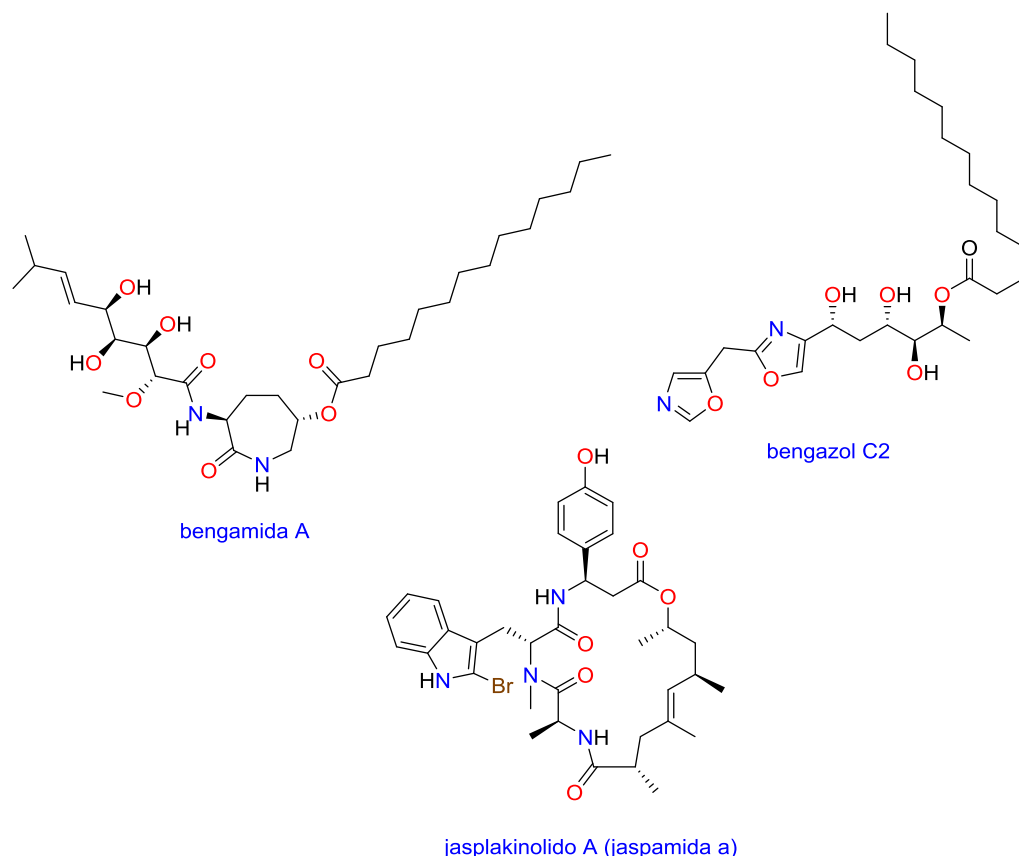
**Esquema 5.** Clasificación de las esponjas pertenecientes al género *Bubaris*.

### 3.1. Compuestos aislados con anterioridad del género *Jaspis*

Las esponjas del género *Jaspis* son productoras de metabolitos secundarios de gran diversidad estructural. Algunos de estos compuestos presentan una gran variedad de perfiles biológicos como citotóxicos, antihelmínticos y antibióticos.<sup>53</sup>

<sup>53</sup> García-Ruiz, C.; Sarabia, F. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 1580–1622.

Dentro de la gran variedad de compuestos aislados de las esponjas del género *Jaspis*, hay tres familias de compuestos que destacan por encima del resto. Por un lado, las bengamidas<sup>54</sup> y los bengazoles,<sup>55</sup> aislados por primera vez en 1986 por Crews, y por otro lado, los ciclodepsipéptidos jaspamidas<sup>56</sup> o jaspaklinolidos aislados simultáneamente en 1986 por Molinski<sup>57</sup> y Crews,<sup>58</sup> destacan por su considerable actividad citotóxica.



**Figura 55.** Compuestos principales aislados de especies pertenecientes al género *Jaspis*.

<sup>54</sup> Thale, Z.; Kinder, F. R.; Bair, K. W.; Bontempo, J.; Czuchta, A. M.; Versace, R. W.; Phillips, P. E.; Sanders, M. L.; Wattanasin, S.; Crews, P. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1733–1741.

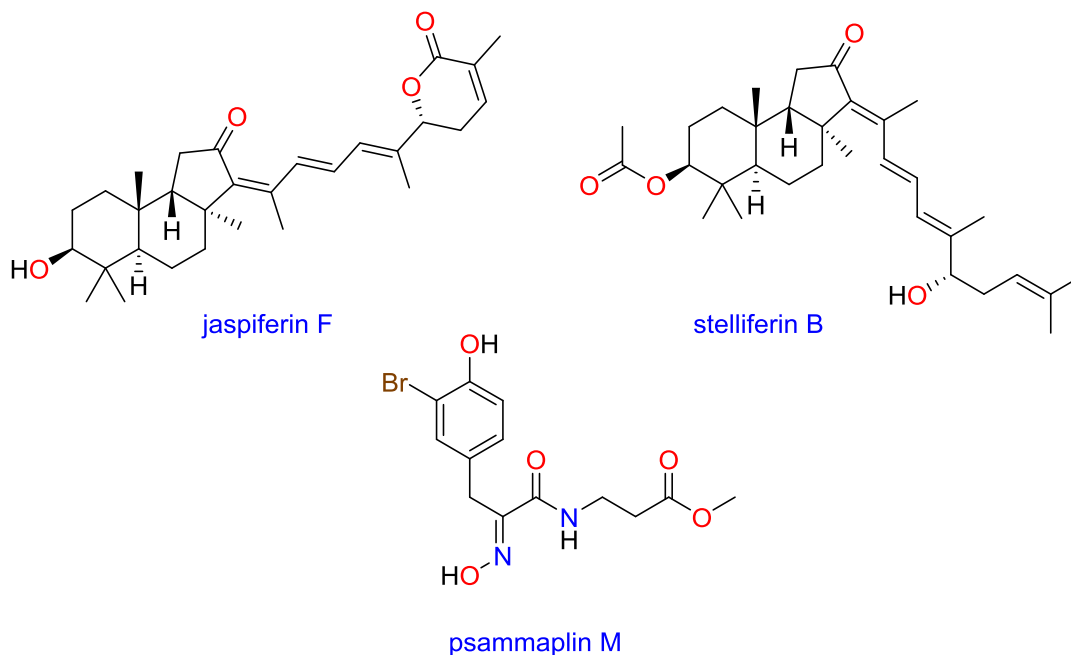
<sup>55</sup> Rodriguez, J.; Nieto, R.M.; Crews, P. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 2034–2040.

<sup>56</sup> Ebada, S. S.; Wray, V.; de Voogd, N. J.; Deng, Z.; Lin, W.; Proksch, P. *Mar. Drugs* **2009**, 7, 435–444.

<sup>57</sup> Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, J.; Xu, C.; Jon, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3123–3124.

<sup>58</sup> Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2797–2800.

Ademas de estos tres grupos principales, se han aislado otros compuestos activos como los jaspiferales,<sup>59</sup> stelliferinas<sup>60</sup> y psammaplinas.<sup>61</sup>



**Figura 56.** Compuestos aislados especies pertenecientes al género *Jaspis*.

<sup>59</sup> Kobayashi, J.; Yuasa, K.; Kobayashi, T.; Sasaki, T.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1996**, 52, 5745–5750.

<sup>60</sup> Tsuda, M.; Ishibashi, M.; Agemi, K.; Sasaki, T.; Kobayashi, J. *Tetrahedron* **1991**, 47, 2181–2194.

<sup>61</sup> Shinde, P. B.; Lee, Y. M.; Dang, H. T.; Hong, J.; Lee, C. O.; Jung, J. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 6414–6418.

3.2. Asociación *Jaspis* sp. cf *lutea* y *Bubaris* sp.

3.2.1. Identificación y clasificación

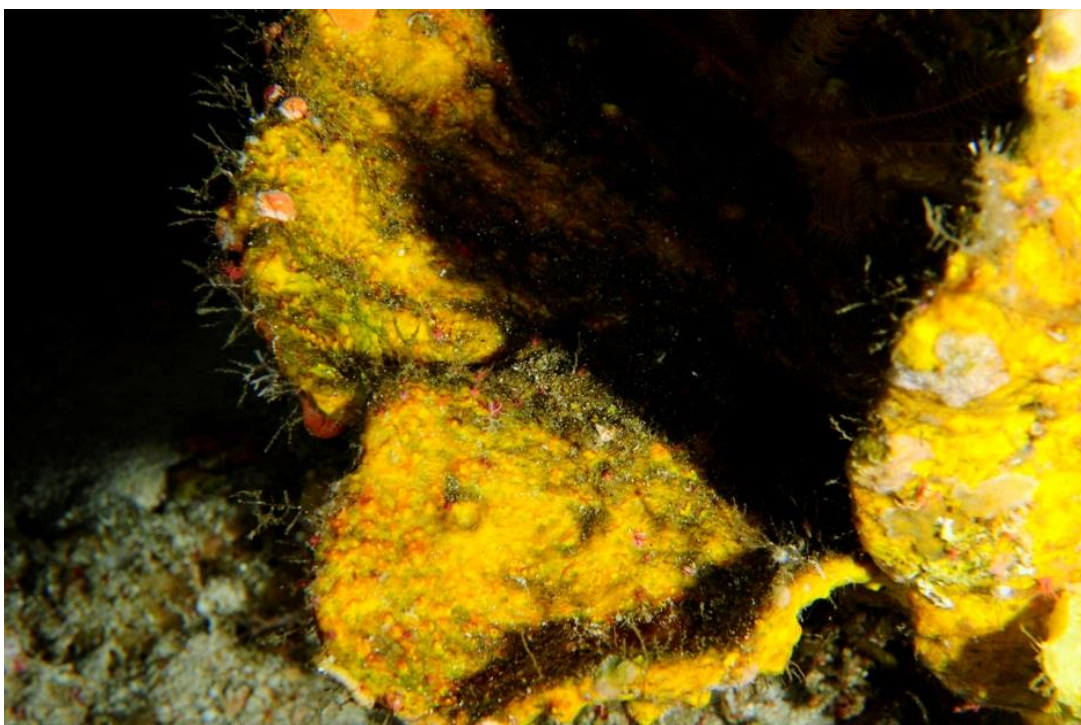
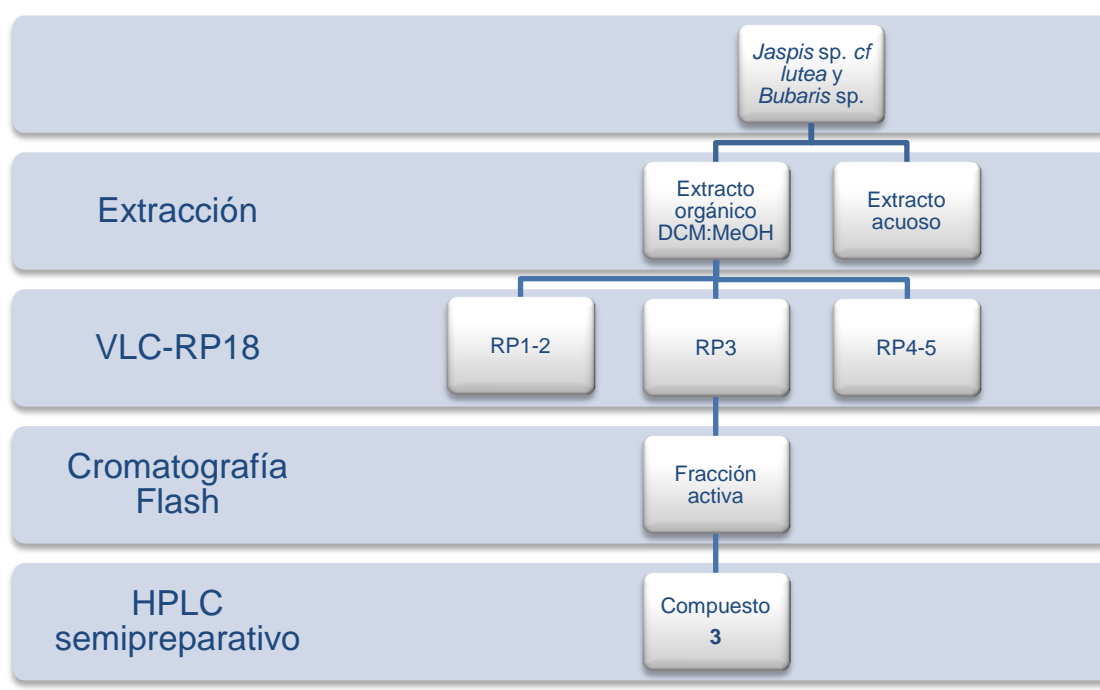


Figura 57. Fotografía de la asociación de esponjas *Jaspis* sp. cf *lutea* y *Bubaris* sp.

Durante la recolección organizada por PharmaMar en Lombok (Indonesia), en septiembre de 2012, se recogió una muestra que resultó ser una asociación de esponjas del género *Jaspis* cf *lutea* y *Bubaris* cerca de Pulau Saujung (117° 32.288'E 07° 20.375'S) usando el sistema de buceo de rebreather en profundidad, el cual permite reciclar el aire exhalado y permitir el buceo durante más tiempo. El estudio taxonómico de ambas esponjas, se llevó a cabo en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la Dra. Maria Jesús Uriz Lespe. Debido a la imposibilidad de separar las dos esponjas, estas se estudiaron conjuntamente, codificándolas como ORMA119230. De los 249 g recogidos, 229 g se sometieron a estudio presentando una alícuota de su extracto orgánico actividad citotóxica a una concentración 1 µg/mL.

### 3.2.2. Extracción y fraccionamiento

El procedimiento de aislamiento se llevó a cabo como se detalla en el Capítulo 1, donde la fracción metanólica obtenida por VLC, con un peso en seco de 1.88 g, se fraccionó mediante cromatografía flash, localizando la actividad en una fracción que después de eliminar el disolvente a presión reducida pesó 257 mg. Esta fracción se purificó mediante HPLC semipreparativo, para obtener 130 mg del compuesto **3**. Todo el proceso de aislamiento se resume en el Esquema 6.



**Esquema 6.** Fraccionamiento de la asociación de esponjas *Jaspis sp. cf. lutea* y *Bubaris sp.*

El proceso de fraccionamiento fue guiado por la actividad citotóxica de todas las fracciones obtenidas en un panel de 3 líneas celulares: A-549 (pulmón), HT-29 (colon) y MDA-MB-231 (mama). Sólo se estudiaron aquellas fracciones que presentaron actividad superior a 1 µg/mL, dando lugar al aislamiento del compuesto nuevo **3**. Todas las fracciones activas se estudiaron mediante espectrometría de masas acoplada a un HPLC como se indica en el Capítulo 1.

## 3.2.3. Determinación estructural

## 3.2.3.1. Aplyzanzine B (3)

El compuesto **3** se aisló como un sólido marrón con una rotación óptica específica de  $[\alpha]_D + 47.5$  (c 0.1, MeOH). El espectro de infrarrojo de **3** presentó unas bandas a IR  $\nu_{\max}$  2972, 1684, 1544, 1474, 1424, 1261, 1200 y 1130  $\text{cm}^{-1}$ ; y el espectro de ultravioleta-visible mostró un máximo de absorción UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  259 nm. El estudio del espectro de masas de alta resolución HRESITOFMS de **3** (Figura 58) presentó un ión  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  767.9272 correspondiente a una fórmula molecular de  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}^{79}\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_4$  (calc. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}^{79}\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_4$   $m/z$  767.9277  $\Delta m = 0.0005$  uma). La distribución isotópica del ión  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  767, 769, 771, 773 y 775, indicó la presencia de 4 átomos de Br.

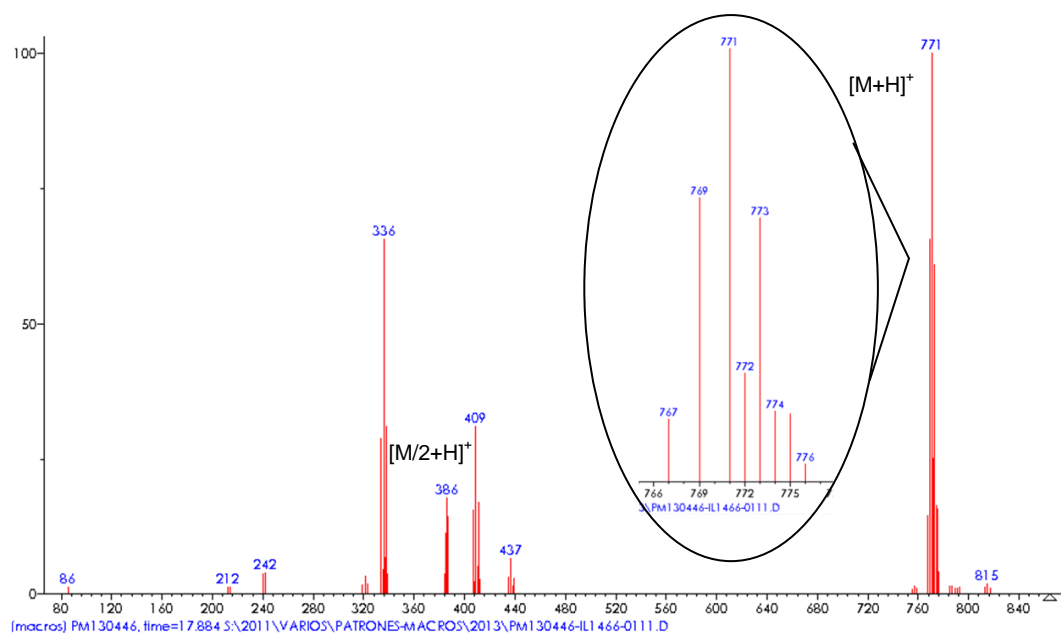


Figura 58. (+) -LRESIMS del compuesto **3**.



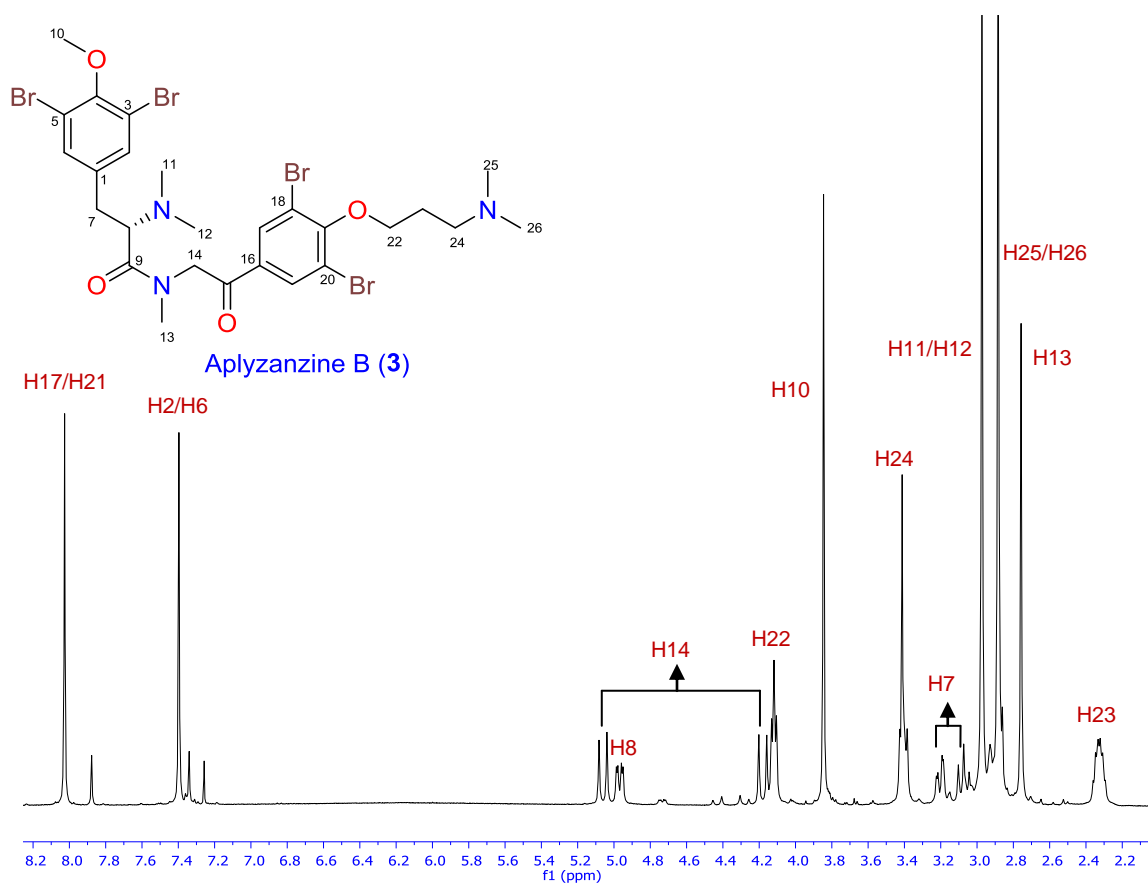


Figura 59. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 3.

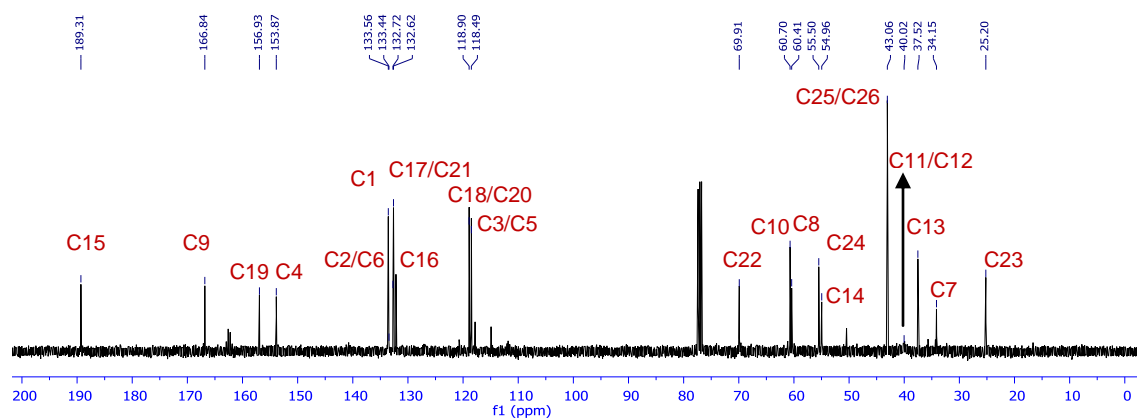


Figura 60. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 3.

Del estudio de los espectros monodimensionales de RMN de protón (Figura 59) y carbono 13 (Figura 60), junto con el espectro bidimensional HSQC-editado (Figura 61) del compuesto **3** se identificaron las multiplicidades de los 26 carbonos mostrados en su fórmula molecular. De los anteriores espectros se deduce que contiene una cetona  $\alpha$ - $\beta$  instaurada, cuyo carbono resuena a  $\delta_C$  189.3, una amida ( $\delta_C$  166.8), seis carbonos aromáticos no protonados ( $\delta_C$  156.9, 153.9, 118.9 (2x) y 118.5 (2x)), cuatro carbonos metínicos  $sp^2$  ( $\delta_H$  8.03/ $\delta_C$  132.7 (2x) y 7.40/133.6 (2x)), cinco carbonos metilénicos  $sp^3$  ( $\delta_H$  3.22;3.09/ $\delta_C$  34.1, 5.06;4.19/54.9, 4.13 / 69.9, 2.32 / 25.3 y 3.42 / 55.5), seis metilos ( $\delta_H$  3.85 / $\delta_C$  60.7, 2.75 / 37.6, 2.97 / 40.0 (2x) y 2.88 / 42.9 (2x)). Todos los desplazamientos se enumeran en la Tabla 8.

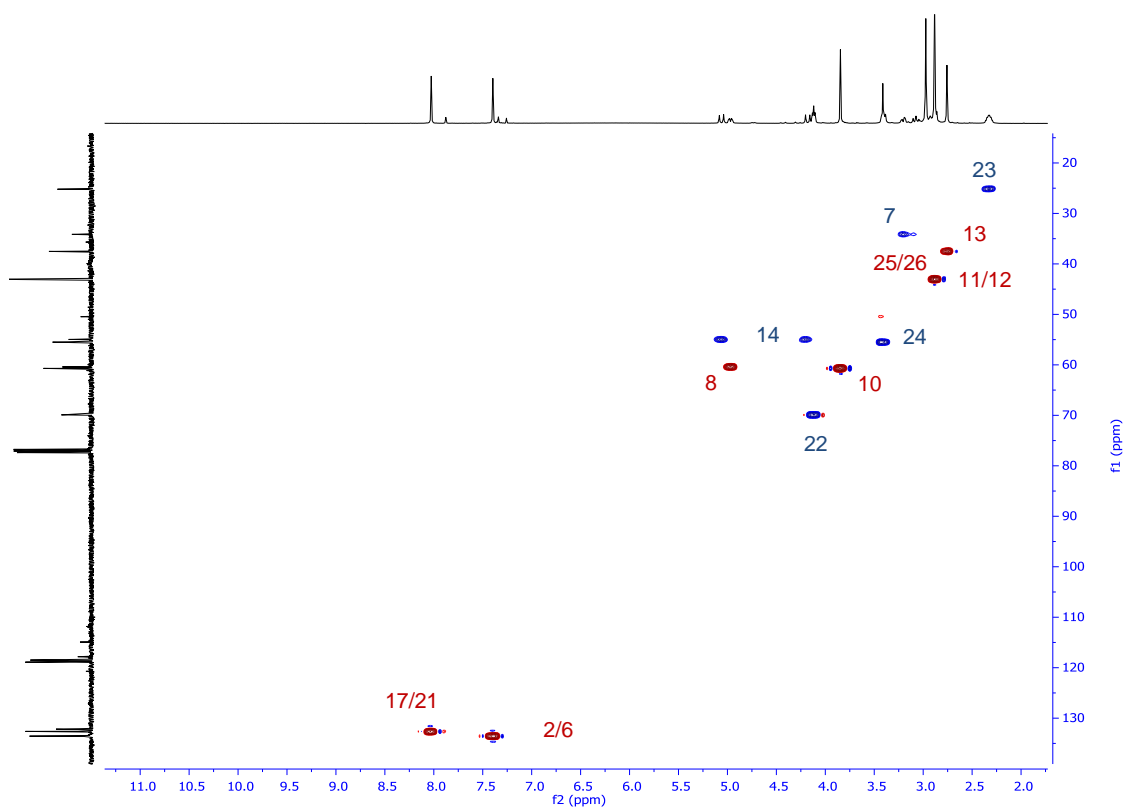
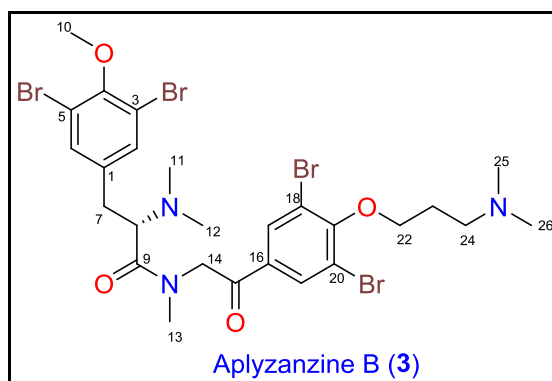
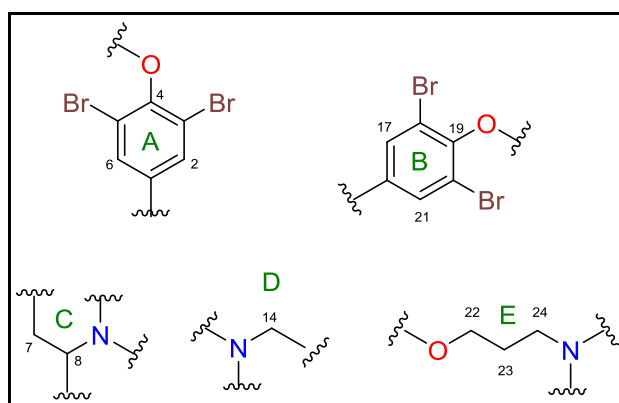


Figura 61. Espectro gHSQC-editado (500 MHz,  $CDCl_3$ ) del compuesto **3**.

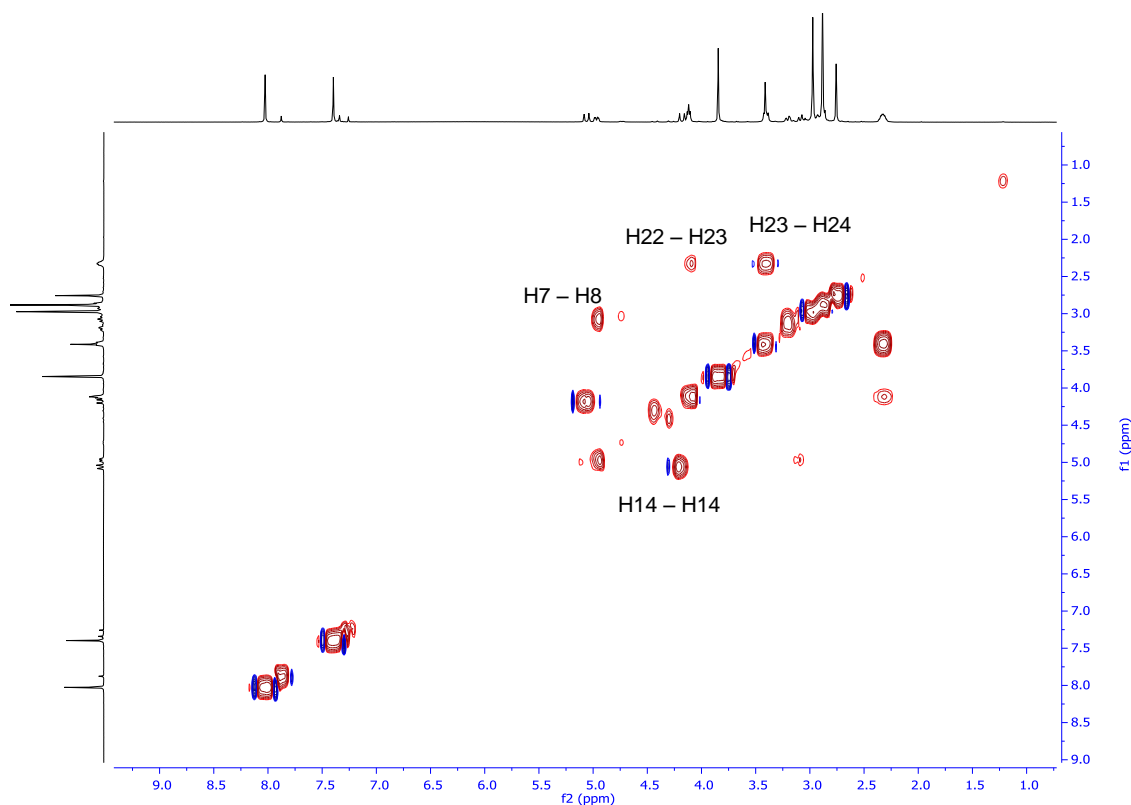
**Tabla 8.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de alyzanzine B (**3**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , m (J in Hz)
1	133.4, C	
2	133.6, CH	7.40, s
3	118.5, C	
4	153.9, C	
5	118.5, C	
6	133.6, CH	7.40, s
7	34.1, $\text{CH}_2$	3.22, dd (12.0, 3.6) 3.09, dd (12.0, 11.8)
8	60.4, CH	4.97, dd (11.8, 3.6)
9	166.8, C	
10	60.7, $\text{CH}_3$	3.85, s
11	40.0, $\text{CH}_3$	2.97, s
12	40.0, $\text{CH}_3$	2.97, s
13	37.6, $\text{CH}_3$	2.75, s
14	54.9, $\text{CH}_2$	5.06, d (17.5) 4.19, d (17.5)
15	189.3, C	
16	132.5, C	
17	132.7, CH	8.03, s
18	118.9, C	
19	157.0, C	
20	118.9, C	
21	132.7, CH	8.03, s
22	69.9, $\text{CH}_2$	4.13, t (5.4)
23	25.3, $\text{CH}_2$	2.32, dddd (11.2, 5.4, 5.4, 5.4, 5.4)
24	55.5, $\text{CH}_2$	3.42, m
25	42.9, $\text{CH}_3$	2.88, s
26	42.9, $\text{CH}_3$	2.88, s

De los desplazamientos obtenidos para los metinos aromáticos (dos a  $\delta_{\text{H}}$  8.03 (2x) y otros dos a  $\delta_{\text{H}}$  7.40 (2x)) y de su multiplicidad como singletes, se dedujo que el compuesto **3** contenía dos anillos aromáticos simétricos 1,3,4,5-tetrasustituidos (**A**  $\rightarrow$  C1-C6 y **B**  $\rightarrow$  C16-C21) (ver Figura 62). Los desplazamientos de C4 ( $\delta_{\text{C}}$  153.9) y C19 ( $\delta_{\text{C}}$  157.0) fueron asignados a carbonos aromáticos enlazados a oxígeno, que conjuntamente con los desplazamientos de C3 ( $\delta_{\text{C}}$  118.5) y C19 ( $\delta_{\text{C}}$  118.9) y la presencia de 4 átomos de bromo en la molécula explican la sustitución de los anillos **A** y **B**. Por otro lado, los desplazamientos de C8 ( $\delta_{\text{H}}$  4.97 /  $\delta_{\text{C}}$  60.4), C14 ( $\delta_{\text{H}}$  5.06; 4.19 /  $\delta_{\text{C}}$  54.9), C24 ( $\delta_{\text{H}}$  3.42 /  $\delta_{\text{C}}$  55.5) y C22 ( $\delta_{\text{H}}$  4.13 /  $\delta_{\text{C}}$  69.9) indican la unión de estos carbonos a heteroátomos. El estudio del  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (ver Figura 63) de **3** indicó la presencia de tres sistemas de espín diferentes: **C**  $\rightarrow$  C7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.22; 3.09)-C8 ( $\delta_{\text{H}}$  4.97), **D**  $\rightarrow$  C14 ( $\delta_{\text{H}}$  5.06; 4.19) y **E**  $\rightarrow$  C22 ( $\delta_{\text{H}}$  4.13)-C23 ( $\delta_{\text{H}}$  2.32)-C24 ( $\delta_{\text{H}}$  3.42), tal como se indica en la Figura 62:



**Figura 62.** Fragmentos estructurales obtenidos mediante los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de aplyzanzine B (**3**).



**Figura 63.** Espectro gCOSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3**.

Mediante el estudio del experimento bidimensional HMBC se situó el grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.85/ $\delta_{\text{C}}$  60.7) sobre la posición C4 del anillo **A** y los dos grupos *N*-metilo C11/C12 ( $\delta_{\text{H}}$  2.97/ $\delta_{\text{C}}$  40.0) sobre el carbono en la posición C8 ( $\delta_{\text{C}}$  60.4). Adicionalmente, por medio de correlaciones HMBC el grupo *N*-metilo C13 ( $\delta_{\text{H}}$  2.75/ $\delta_{\text{C}}$  37.6) se localizó sobre el nitrógeno unido a C14 ( $\delta_{\text{C}}$  54.9) y la pareja restante de grupos *N*-metilo C25/C26 ( $\delta_{\text{H}}$  2.88/ $\delta_{\text{C}}$  42.9) se enlazaron al nitrógeno unido a C24 ( $\delta_{\text{C}}$  55.5).

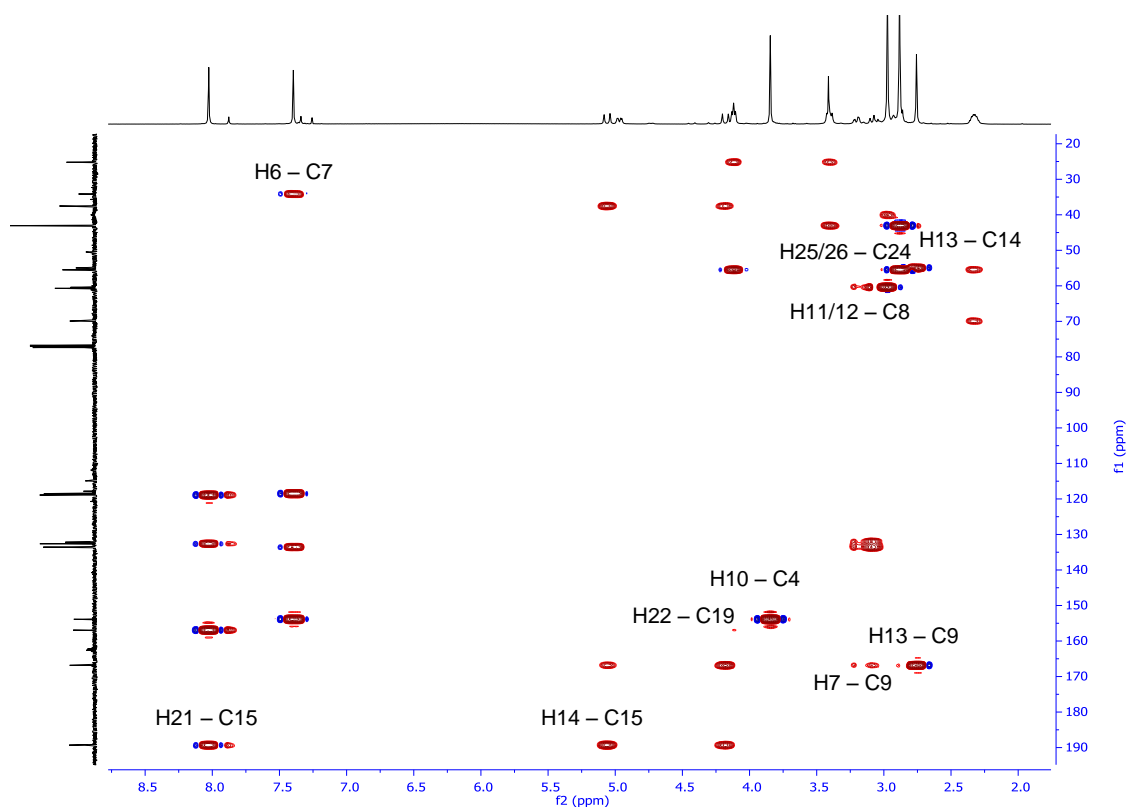


Figura 64. Espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3**.

Por último, los diferentes sistemas de espín y los carbonilos C9 y C14, se conectaron mediante las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia observadas en el experimento HMBC (Figura 64), mostrando la presencia de los sistemas: *N*, *N'*-dimetilamino-4-metoxi-3,5-dibromotirosina, *N*-metilamino-3,5-dibromotiramina y 3-aminopropanol. En dicho experimento se observan correlaciones entre el protón de H6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.40) con el carbono C7 ( $\delta_{\text{C}}$  34.1), el H7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.22; 3.09) con C9 ( $\delta_{\text{C}}$  166.8), el H14 ( $\delta_{\text{H}}$  5.06; 4.19) con el C15 ( $\delta_{\text{C}}$  189.3), el H21 ( $\delta_{\text{H}}$  8.03) con el C15 ( $\delta_{\text{C}}$  189.3) y el H22 ( $\delta_{\text{H}}$  4.13) con el C19 ( $\delta_{\text{C}}$  156.9). Todos estos datos espectroscópicos sugieren que la estructura de **3** se corresponde con la mostrada en la Figura 65.

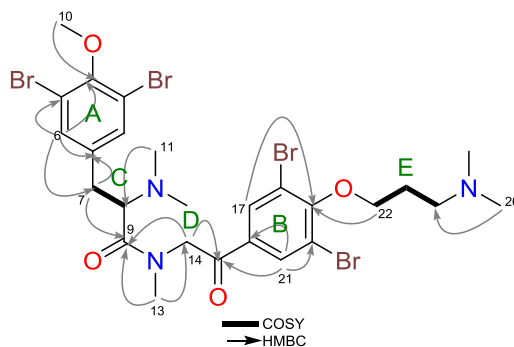
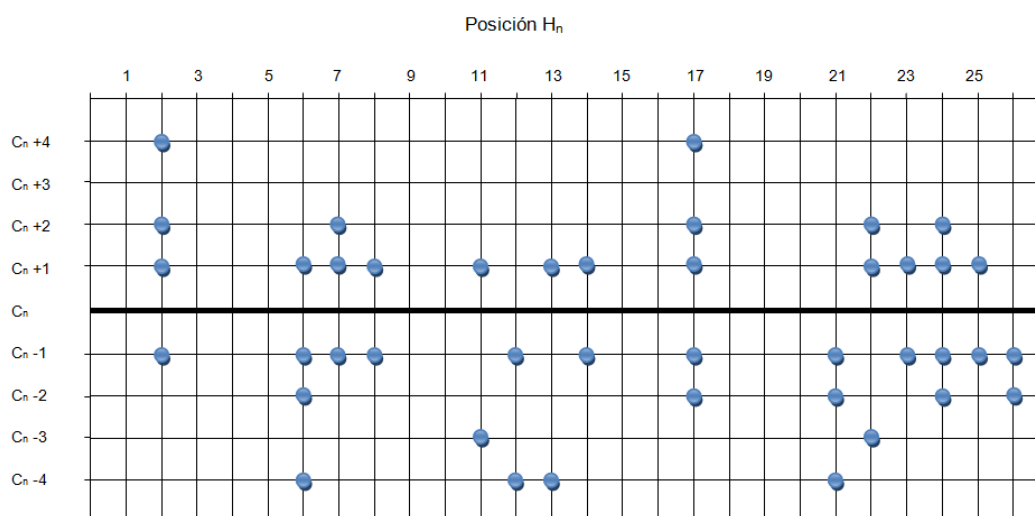


Figura 65. Correlaciones observadas en los experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y HMBC del compuesto **3**.

El resumen de las correlaciones observadas en el experimento bidimensional HMBC del compuesto **3**, mostrado en la Figura 64, se resumen en la Figura 66:



**Figura 66.** Correlaciones HMBC observadas en el compuesto **3**.

Con el fin de confirmar la estructura plana del compuesto **3** obtenida por HMBC, se realizó un experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY para asegurar la secuencia de los diferentes sistemas de espín. Las correlaciones NOE observadas entre los protones **H2/H6** ( $\delta_{\text{H}}$  7.40) con el protón **H7** ( $\delta_{\text{H}}$  3.22; 3.09) y los **H2/H6** ( $\delta_{\text{H}}$  7.40) con **H8** ( $\delta_{\text{H}}$  4.97) permitieron confirmar que los sistemas **A** y **C** están contiguos. Por su parte, las correlaciones ROE entre **H17/H21** ( $\delta_{\text{H}}$  8.03) con **H14** ( $\delta_{\text{H}}$  5.06; 4.19) sirvieron para confirmar la conexión estructural de los fragmentos **B** y **D**, ratificando de esta forma la estructura propuesta.

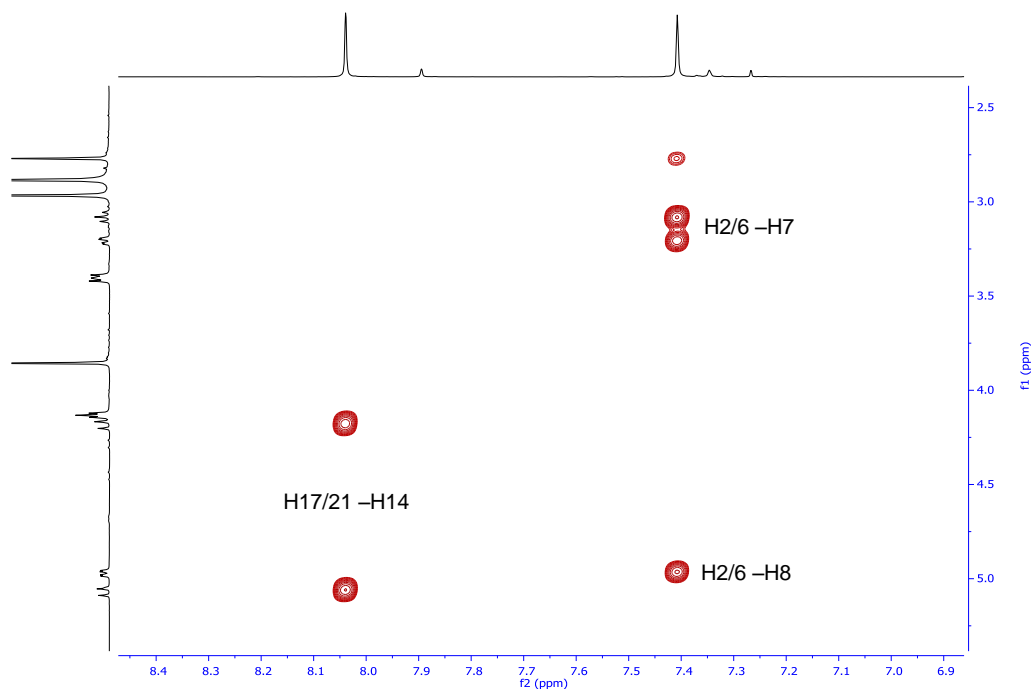


Figura 67. Ampliación correlaciones clave experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY del compuesto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

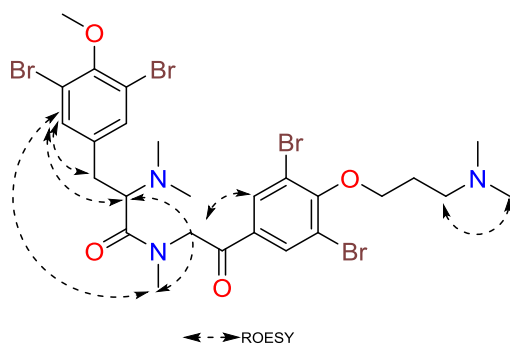


Figura 68. Correlaciones seleccionadas del experimento ROESY del compuesto **3**.

Del estudio de los fragmentos observados en los experimentos de espectrometría de masas se corroboró la estructura plana propuesta de **3** en donde la fragmentación selectiva de los iones  $[\text{M}+\text{H}]^+$  indicó la pérdida del fragmento de dibromometoxitirosina presente en **3**.



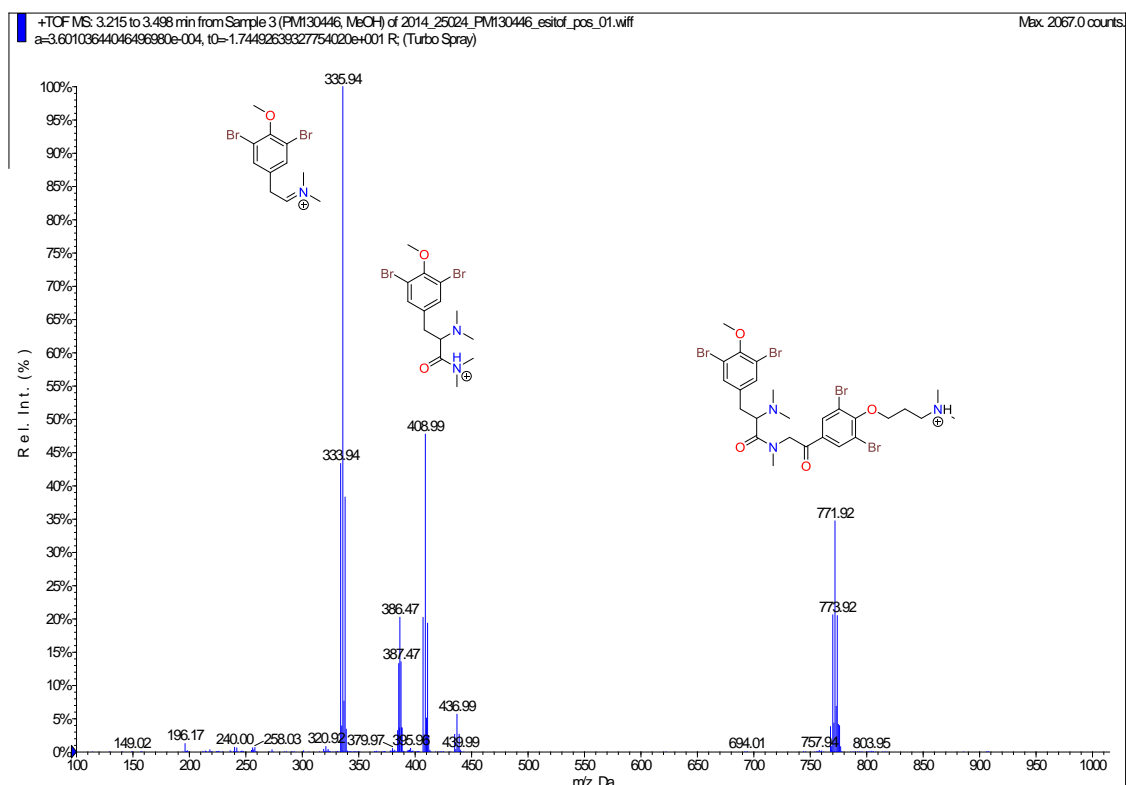


Figura 69. Espectro HRESI MS/MS (modo ión positivo) del compuesto 3.

Mediante la selección de los iones  $[M+H]^+$  a  $m/z$  767.9 (Figura 70) y 771.9 (Figura 71), con cuatro isótopos de  $^{79}\text{Br}$  y con dos isótopos  $^{79}\text{Br}$  y otros dos  $^{81}\text{Br}$ , respectivamente, se obtuvieron los iones de  $m/z$  333.94 y 335.94, correspondientes al fragmento de dibromometoxitirosina.

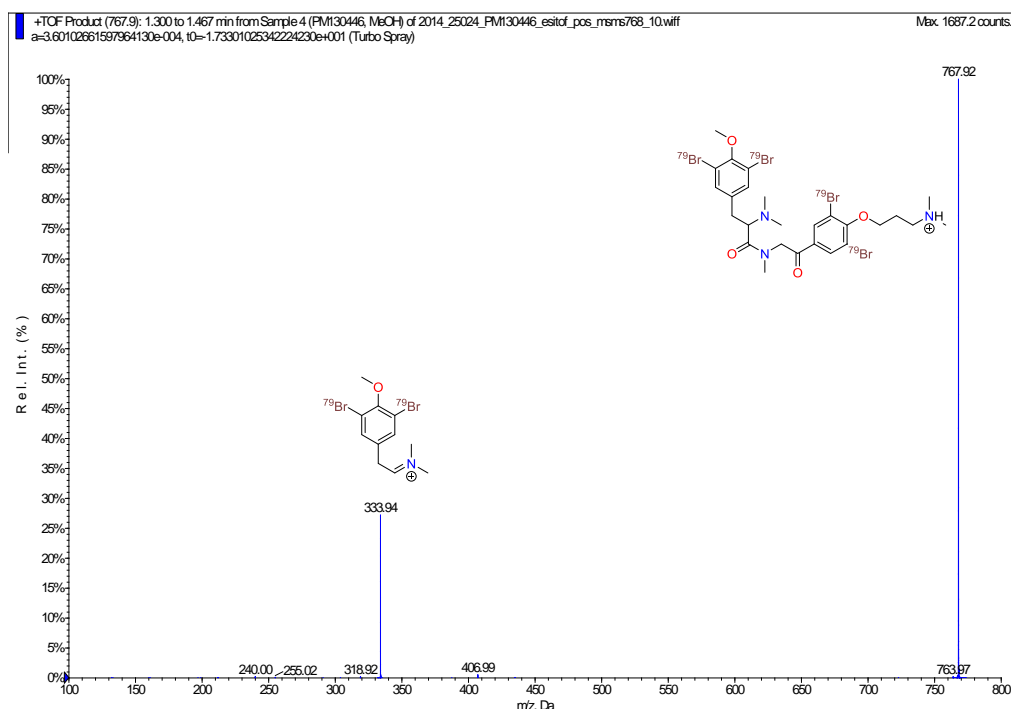


Figura 70. Fragmentación MS/MS de alta resolución del ion de  $m/z$  767.92 del compuesto 3.

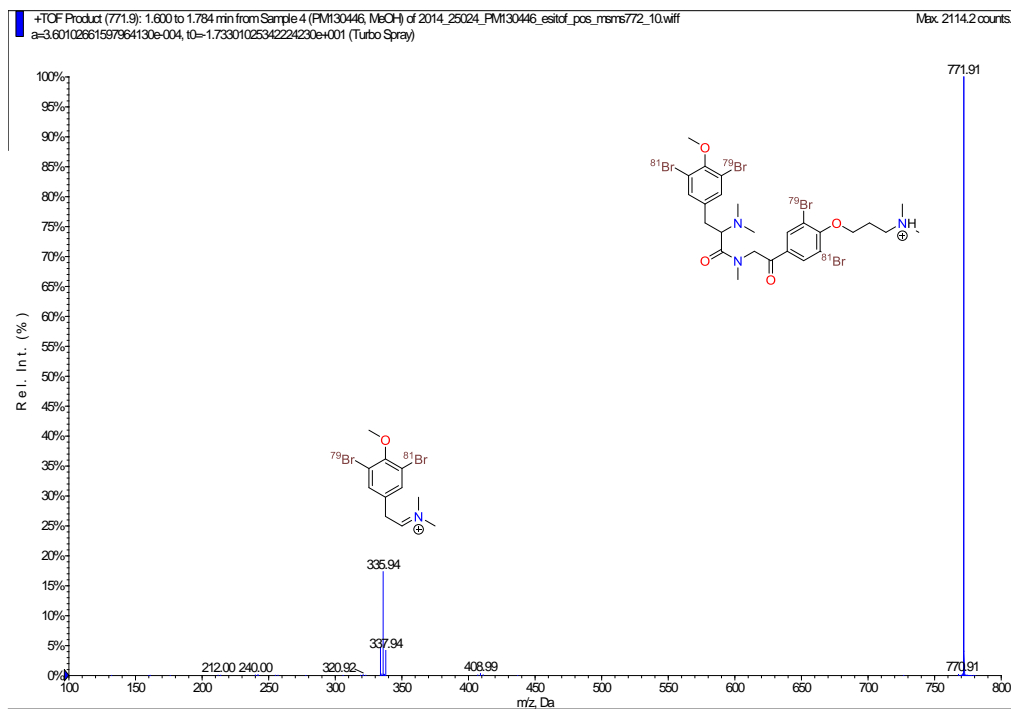


Figura 71. Fragmentación MS/MS de alta resolución del ion de  $m/z$  771.91 del compuesto 3.

Una vez analizados los picos del espectro MS/MS en modo alta resolución, se identificaron los siguientes fragmentos (Figura 72), confirmando la estructura propuesta por el estudio de su RMN del compuesto 3:

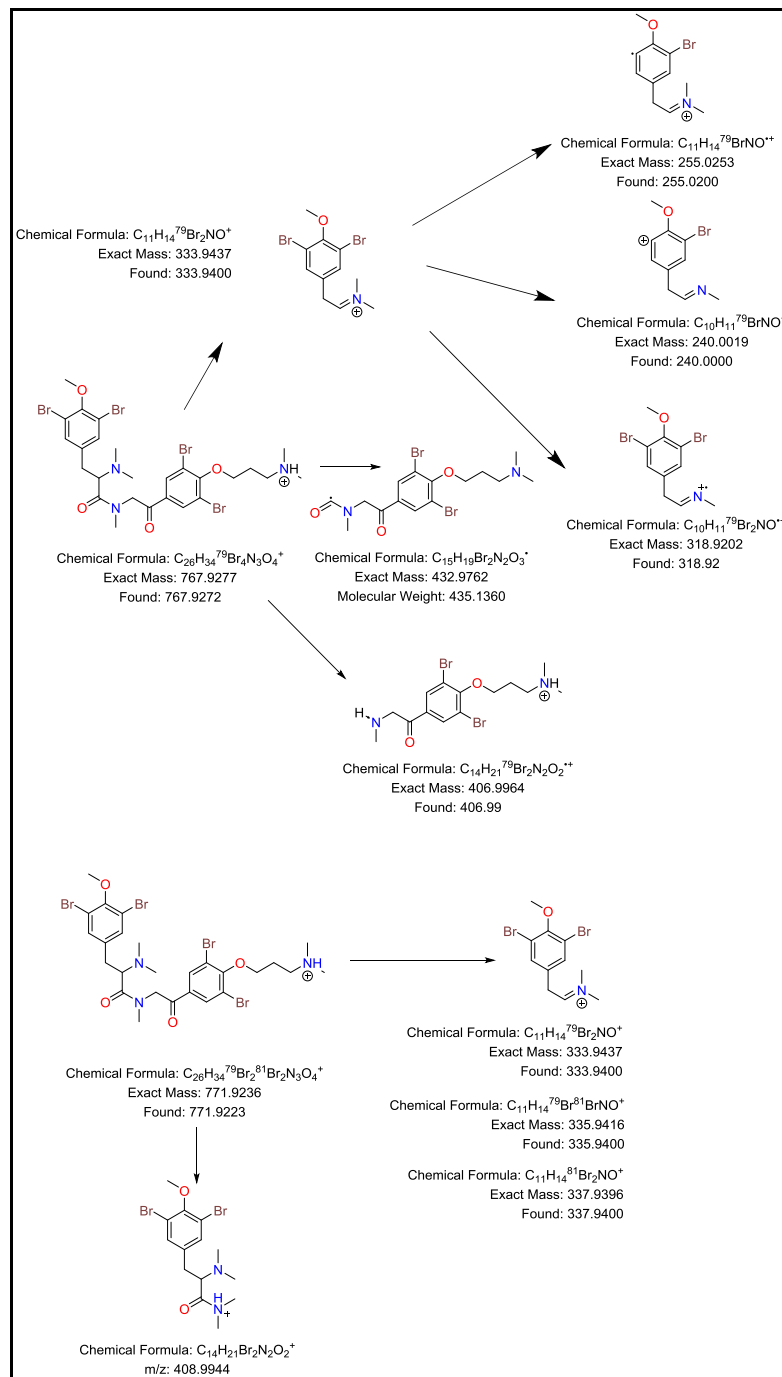


Figura 72. Fragmentos del compuesto 3 obtenidos mediante MS/MS de alta resolución.

Una búsqueda mediante las bases de datos Marinlit y SciFinder confirmó que se trataba de un compuesto no descrito previamente, a la que se denominó aplyzanzine B, por su similitud estructural con el compuesto ya descrito anteriormente aplyzanzine A.<sup>62</sup> En esta ocasión, la estructura ‘tirosina’-‘tiramina’-‘3-aminopropanol’, también se encuentra en la molécula previamente descrita aplysamine 4.<sup>63</sup>

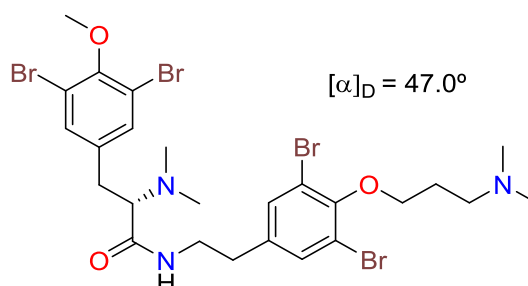


Figura 73. Estructura de aplyzanzine A (3).

De forma análoga a anomoian B, la determinación de la estereoquímica absoluta del compuesto **3** se basó en la comparación de su valor de rotación específica  $[\alpha]_D$  con algunos de los análogos descritos de este compuesto como son el *iso*-anomoian, con un valor de 14.5, y la suberedamina A,<sup>62</sup> con un valor de 19.5.

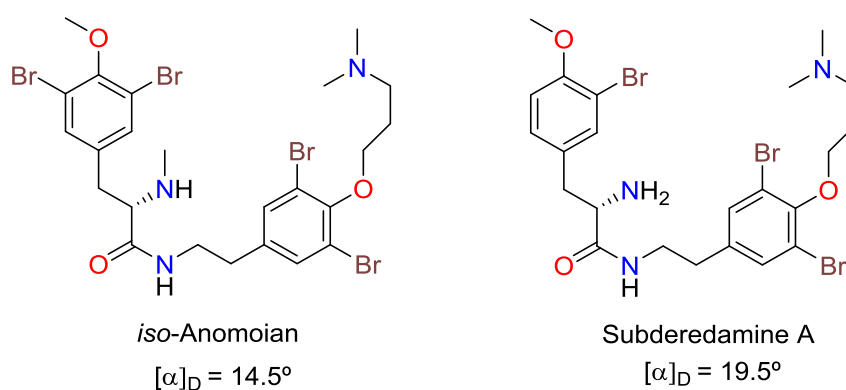


Figura 74. Estructuras de compuestos con la misma estereoquímica que el compuesto **3**.

<sup>62</sup> Kottakota, S. K.; Evangelopoulos, D.; Alnimr, A.; Bhakta, S.; McHugh, T. D.; Gray, M.; Groundwater, P. W.; Marrs, E. C. L.; Perry, J. D.; Spilling, C. D.; Harburn, J. J. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1090–1101.

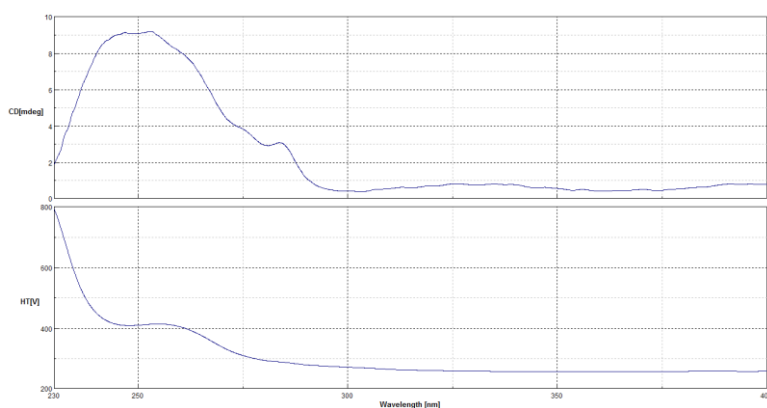
<sup>63</sup> Jurek, J.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1609–1612.

El valor positivo de  $[\alpha]_D$  del compuesto **3** de 47.5 indica que la estereoquímica de la posición C8 deber ser idéntica a la de los compuestos anteriormente citados, siendo por lo tanto S.

**Tabla 9.** Valores de  $[\alpha]_D$  de derivados de bromotirosina con configuración S.

Compuestos	$[\alpha]_D$
<i>iso</i> -Anomoian	14.5
Suberedamine A	19.5
Aplyzanzine B	47.5

También se obtuvo su espectro de CD (ver Figura 75 ).



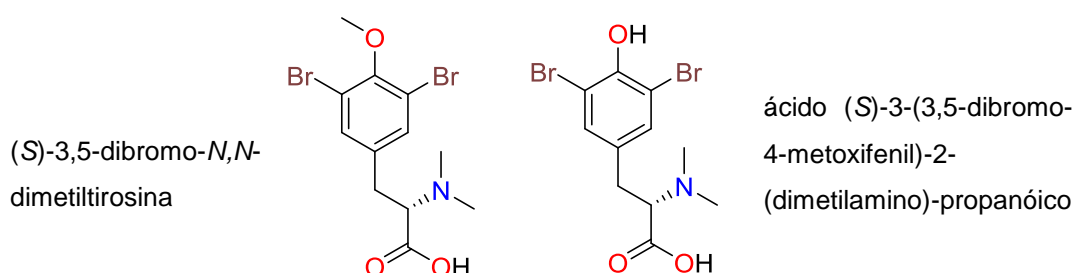
**Figura 75.** Espectro CD para el compuesto **3**.

La actividad citotóxica del compuesto **3** se evaluó en un panel de 3 líneas celulares:<sup>64</sup> A-549 (pulmón), HT-29 (colon) y MDA-MB-231 (mama), obteniéndose valores del GI<sub>50</sub> dentro del rango micromolar (4.6 µM, 1.3 µM y 5.3 µM, respectivamente). Los datos se recogen en la Tabla 10. El compuesto **3** también mostró actividad antibacteriana moderada frente a cepas Gram positivas.

**Tabla 10.** Actividad citotóxica del compuesto **3**.

Línea celular	GI <sub>50</sub>	TGI	LC <sub>50</sub>
A549	4.6 µM	7.5 µM	>11 µM
HT-29	13 µM	2.2 µM	6.3 µM
MDA-MB-231	53 µM	8.4 µM	>11 µM

Con el fin de disponer de los dos fragmentos principales de **3** y observar su actividad citotóxica, se realizó un estudio sobre la relación estructura-actividad (SAR), el compuesto **3** se hidrolizó a 150 °C bajo condiciones ácidas, aislándose los compuestos (S)-3,5-dibromo-*N,N*-dimetiltirosina y ácido (S)-3-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-2-(dimetilamino)-propanóico, cuyas estructuras fueron deducidas por RMN y por espectrometría masas de alta resolución que mostraron sus respectivas fórmulas moleculares como C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> y C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>. Los valores positivos de [α]<sub>D</sub> 30.5 y 33.2 respectivamente, confirmaron la misma estereoquímica en C8 que **3**. (*R*)-3,5-dibromo-*N,N*-dimetiltirosina se había obtenido previamente de la hidrólisis ácida de ianthesine A,<sup>65</sup> mientras que el segundo fragmento se ha utilizado como intermedio sintético en derivados de bromotirosina.<sup>66</sup> Ninguno de estos compuestos presentó actividad citotóxica.



**Figura 76.** Compuestos obtenidos de la hidrólisis de **3**.

<sup>64</sup> Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1112–1116.

<sup>65</sup> Okamoto, Y.; Ojika, M.; Kato, S.; Sakagami, Y. *Tetrahedron* **2000**, 56, 5813–5818.

<sup>66</sup> Kottakota, S. K.; Evangelopoulos, D.; Alnimr, A.; Bhakta, S.; McHugh, T. D.; Gray, M.; Groundwater, P. W.; Marrs, E. C. L.; Perry, J. D.; Spilling, C. D.; Harburn, J. J. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1090–1101.

### 3.3. Estudio del mecanismo de acción de los compuestos derivados de bromotirosina

#### 3.3.1. Inhibición de las histonas deacetilasas (HDAC)

En este apartado se pasa a describir el estudio del mecanismo de acción de las dos nuevas bromotirosinas aisladas anomoian B (**1**) y aplyzanzine B (**3**). Este estudio fue realizado gracias a la Dra. Gema Santamaría y Paloma Fernández.

Se ha descrito que el mecanismo de acción de algunos derivados de las bromotirosinas, como psammaplin A (Figura 77), está relacionado con la inhibición de las histonas deacetilasas (HDACs).<sup>67</sup> Estas son proteínas responsables de la compactación del ADN para formar la cromatina. Mediante su acetilación, por las histona acetil transferasas (HTAs), o desacetilación, por las histona deacetil transferasas (HDACs), las células controlan el enrollamiento o desenrollamiento del ADN alrededor de las histonas y con ello la expresión génica. Esta modificación reversible de las histonas en su forma acetilada, y por lo tanto menos compacta, permite la transcripción de conjuntos de genes que afectan al ciclo celular, la diferenciación celular y/o la apoptosis. (Figura 78).

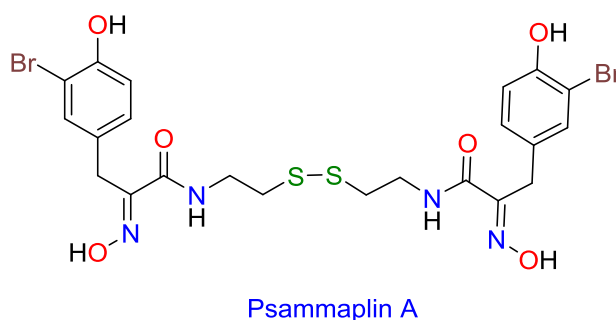
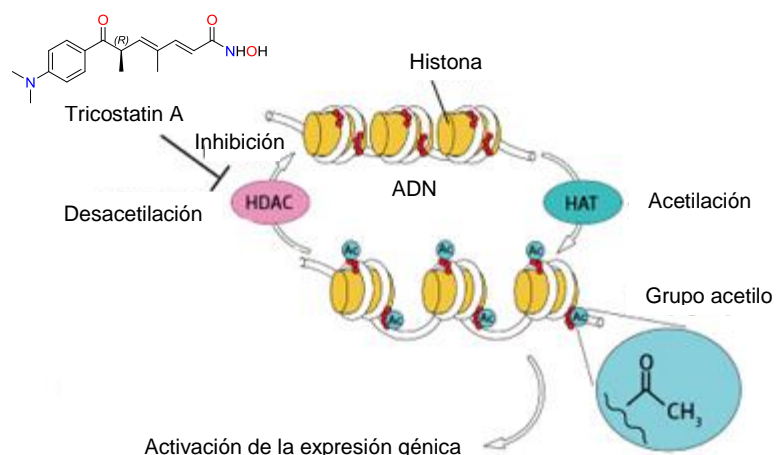


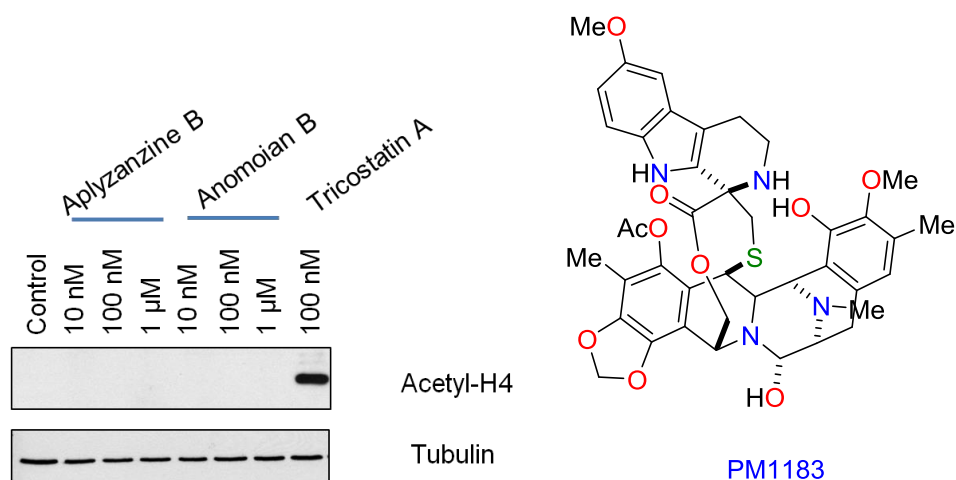
Figura 77. Estructura de psammaplin A.

<sup>67</sup> Kottakota, S. K.; Benton, M.; Evangelopoulos, D.; Guzman, J. D.; Bhakta, S.; McHugh, T. D.; Gray, M.; Groundwater, P. W.; Marrs, E. C. L.; Perry, J. D.; Harburn, J. J. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6310–6313.



**Figura 78.** Mecanismo de inhibición de HDAC.

Con el fin de determinar si estos compuestos pueden funcionar como inhibidores de las HDACs, se analizó la presencia de la histona-4 acetilada producida por el tratamiento con los compuestos **1** y **3** en la línea tumoral de pulmón A-549. Con las concentraciones analizadas (10, 100 y 1000 nM) a las 24h, no se obtuvo acumulación de la histona H4 acetilada como se observó con el control positivo de tricostatina A, un conocido inhibidor de HDACs.<sup>68</sup> (Figura 79).



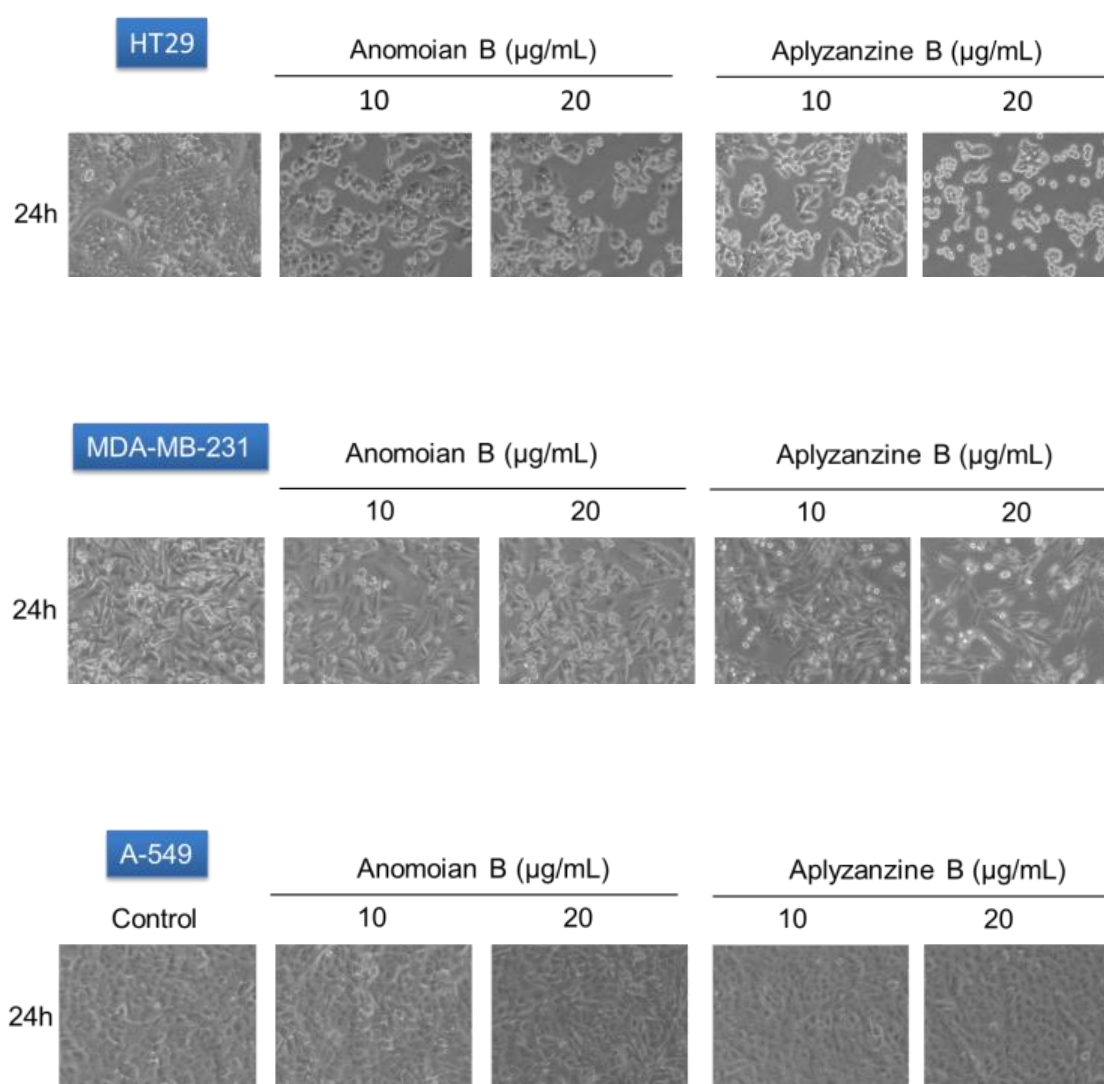
**Figura 79.** Detección de Acetil-H4 mediante western blot en la línea celular A-549 tratada con los compuestos **1**, **3** y el control (tricostatina A).

<sup>68</sup> Hyun-Jung, K.; Suk-Chul, B. *Am. J. Transl. Res.* **2011**, 3, 166–179.



### 3.3.2. Inducción de apoptosis a través de la ruta de las caspasas

El efecto citotóxico de los compuestos **1** y **3** se ha analizado en tres líneas celulares tumorales provenientes de distintos tejidos, A549 de pulmón, HT-29 de colon y MDA-MB-231 de mama. Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos a las 72h de tratamiento con los compuestos fueron de 3.8, 2.4 y 3.9 µg/ml respectivamente para **1** y de 4.7, 1.2 y 6 µg/ml para **3**. El efecto de cada compuesto a distintas concentraciones se puede ver en la Figura 80, en donde se observa una mayor sensibilidad con ambos compuestos en HT-29 y MDA-MB-231 frente a las A-549.



**Figura 80.** Efecto de los compuestos **1** y **3** sobre las líneas celulares A549, HT-29 y MDA-MB-231 (aumento x20 microscopía con luz visible).

Con objeto de analizar si los compuestos ejercen su actividad citotóxica a través de su unión directa al ADN, se realizó un ensayo de *band-shift* en el que los compuestos de interés se incuban en presencia de un fragmento de ADN de 250 pb desnudo durante 1 h a 37 °C y en función de su migración en un gel de agarosa se puede determinar si existe interacción. En el caso de los compuestos **1** y **3**, ninguno afectó a la migración del fragmento de ADN a ninguna de las concentraciones analizadas (100 nM, 1, 10 y 100 µM) en comparación con un compuesto de referencia, el PM01183 que sí interacciona y produce un retraso del fragmento de ADN a concentraciones de 10 y 100 µM (Figura 81).<sup>69</sup>

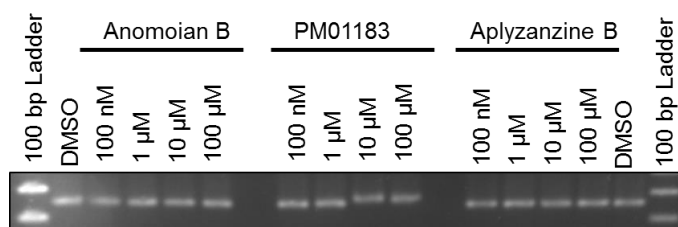


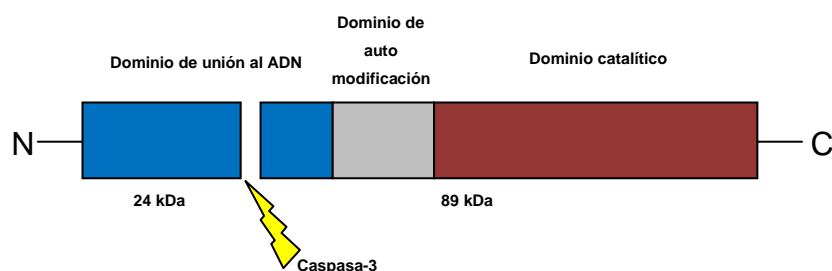
Figura 81. Ensayo *band-shift* de los compuestos **1** y **3** frente a un control positivo.

Por otro lado, Jui-Hsin Su *et al.*, publicaron un artículo en 2013,<sup>70</sup> donde hacía referencia al efecto apoptótico de pequeños derivados de bromotirosina a través de la ruta de activación de las caspasas. La proteína caspasa-3 tiene un papel fundamental en la ejecución por parte de la célula del proceso de apoptosis.

<sup>69</sup> Santamaría, G.; Genes, C. M.; Giraudon, C.; Martínez-Leal, J. F.; Compe, E.; Coin, F.; Aviles, P.; Galmarini, C. M.; Egly, J. M. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2399-2412.

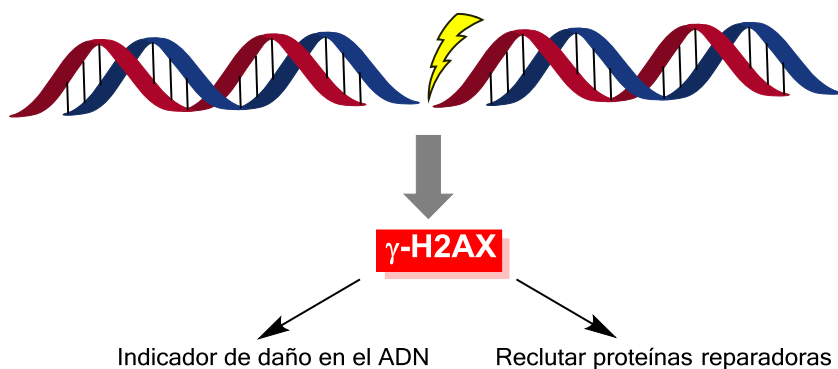
<sup>70</sup> Su, J. H.; Chen, Y. C.; El-Shazly, M.; Du, Y. C.; Su, C. W.; Tsao, C. W.; Liu, L. L.; Chou, Y.; Chang, W. B.; Su, Y. D.; Chiang, M. Y.; Yeh, Y. T.; Lu, M. C. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3168–3185.

Cuando la célula sufre un daño irreparable, la caspasa-3 se activa y dispara el proceso de muerte celular por apoptosis cortando a la proteína PARP en dos fragmentos<sup>71</sup> de 89 kDa y 24 kDa. Este procesamiento es fácil de identificar mediante western-blot. (Figura 82).



**Figura 82.** Fragmentación de PARP mediada por la caspasa-3 activada.

Otro indicador de que la célula está sufriendo una muerte celular por apoptosis es la fragmentación de su ADN. La rotura de las dos cadenas del ADN en la célula viene señalizada por la fosforilación de la histona H2AX, denominada  $\gamma$ -H2AX, y su aparición es una señal inequívoca de daño severo en el ADN (Figura 83).<sup>72</sup>



**Figura 83.** Aparición de  $\gamma$ -H2AX tras la rotura de doble cadena en el ADN.

<sup>71</sup> Kaufmann, S. H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N. E.; Poirier, G. G. *Cancer Res.* **1993**, 53, 3976–3985.

<sup>72</sup> Rogakou, E. P.; Nieves-Neira, W.; Boon, C.; Pommier, Y.; Bonner, W. M. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 9390–9395.

Con el fin de comprobar si los compuestos **1** y **3** inducen apoptosis en las 3 líneas celulares tumorales anteriormente descritas, A-549, HT-29 y MDA-MB-231 se sometieron a tratamientos con 10 y 20 µg de cada compuesto y se analizó la fragmentación de PARP y la aparición de γ-H2AX mediante western-blot.

#### 3.3.2.1. HT-29 (colon)

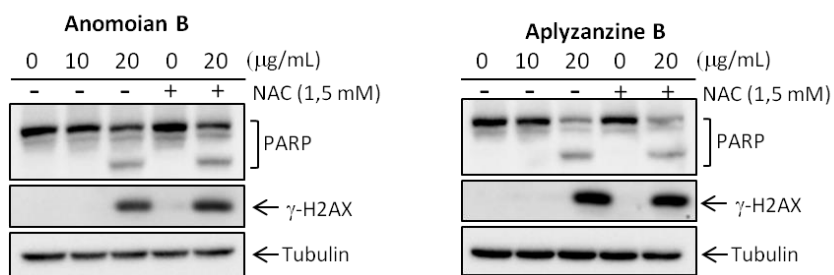
Los resultados obtenidos en la línea HT-29 tratada con los dos compuestos de interés, muestran una clara inducción de la apoptosis mediante un procesamiento de PARP y aparición de γ-H2AX dependiente del tiempo de exposición. Se observó un efecto mayor para la aplyzanzine B (**3**) que para el anomoian B (**1**). Después de 24 h (Figura 84) se observó que la fragmentación de PARP era muy evidente a concentraciones de 20 µg/mL y que aumentando el tiempo de exposición a 30 h (Figura 85) era aún más notable.

Para determinar si en la iniciación de la muerte celular por apoptosis pueden estar interviniendo especies reactivas de oxígeno (ROS), como ya se ha descrito en el caso de (1'*R*,5'*S*,6'*S*)-2-(3',5'-dibromo-1',6'-dihidroxi-4'-oxociclohex-2'-enil) acetonitrilo (DT),<sup>73</sup> se hizo un pretratamiento con el antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC), con objeto de prevenir la formación de los ROS y la activación de la ruta apoptótica a través de la fragmentación de PARP y aparición de γ-H2AX.

---

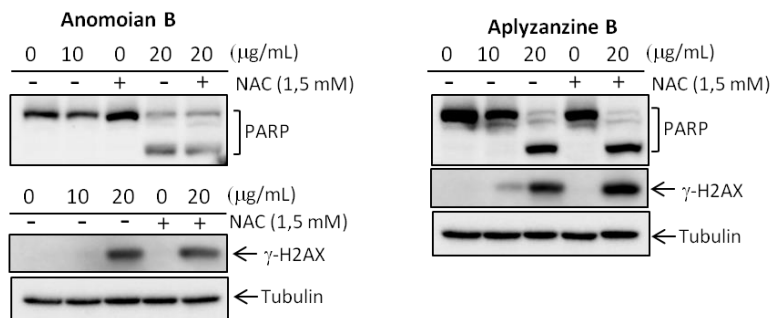
<sup>73</sup> Su, J. H.; Chen, Y. C.; El-Shazly, M.; Du, Y. C.; Su, C. W.; Tsao, C. W.; Liu, L. L.; Chou, Y.; Chang, W. B.; Su, Y. Di; Chiang, M. Y.; Yeh, Y. T.; Lu, M. C. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3168–3185.

## HT-29 (24h)



**Figura 84.** Detección de PARP y  $\gamma$ -H2AX mediante western blot en la línea HT-29 a 24h.

## HT-29 (30h)



**Figura 85.** Detección de PARP y  $\gamma$ -H2AX mediante western blot en la línea HT-29 a 30h.

En el caso de las células HT-29 el pretratamiento con dicho antioxidante a una concentración 1.5 nM no afectó al resultado, indicando que en las condiciones analizadas las especies reactivas de oxígeno parecen no jugar un papel predominante en la inducción de la apoptosis.

## 3.3.2.2. MDA-MB-231 (mama)

En la línea MDA-MB-231, el tratamiento con ambos compuestos a 24 horas mostró un leve procesamiento de PARP, resultado de la disminución de la intensidad de la banda sin procesar a 20  $\mu\text{g/mL}$ , y la aparición de H2AX fosforilado a esta misma concentración. El tratamiento previo con el antioxidante NAC no produjo ningún efecto sobre el procesamiento de PARP y la aparición de  $\gamma\text{-H2AX}$ , en estas condiciones (Figura 86).

## MDA-MB-231 (24h)

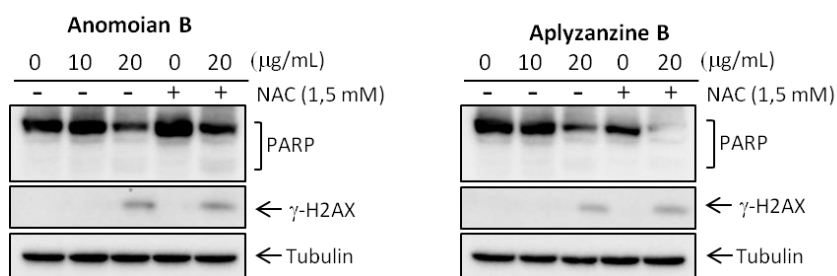


Figura 86. Detección de PARP y  $\gamma\text{-H2AX}$  mediante western blot en la línea MDA-MB-231 a 24h.

## 3.3.2.3. A-549 (pulmón)

En la línea celular A-549, el tratamiento durante 48 h (Figura 87) apenas indujo la fragmentación de PARP, aunque sí se detectó la presencia de  $\gamma\text{-H2AX}$  a la concentración más alta de tratamiento, 20  $\mu\text{g/mL}$ .

## A549 (48h)

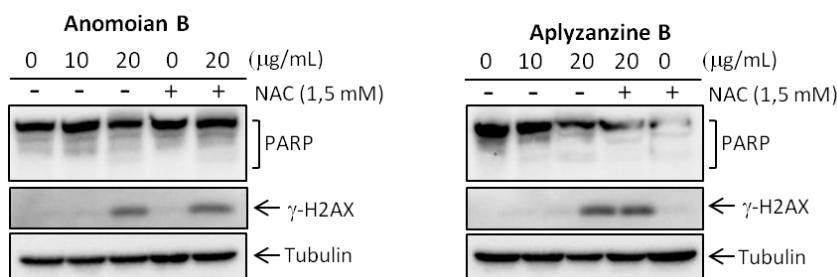
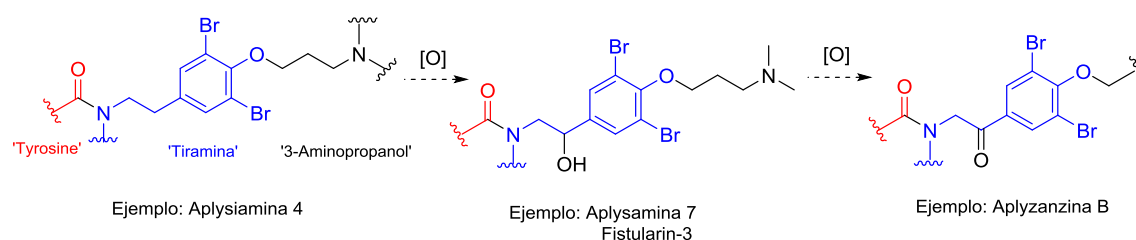


Figura 87. Detección de PARP y  $\gamma\text{-H2AX}$  mediante western blot en la línea A549 a 48h.

De este modo, se puede concluir que ambos compuestos inducen apoptosis en las tres líneas celulares estudiadas, siendo mucho más sensibles las células de colon HT-29. Como aproximación inicial, también se puede concluir que ninguno de los compuestos inducen la generación de especies oxidativas.

Finalmente, alyzanzina B es el primer compuesto derivado de la bromotirosina con un grupo cetona adyacente al anillo de dibromobenceno. Biogenéticamente, el grupo cetona puede proceder de la oxidación de la posición bencílica en la unidad de tiramina. Compuestos con un grupo OH en esa posición, ya han sido publicados como hemifistularin 3,<sup>74</sup> alysamina A<sup>75</sup> y fistularin-3.<sup>76</sup>



**Figura 88.** Propuesta biogénica para el grupo cetona presente en el compuesto 3.

<sup>74</sup> Kubo, H.; Matsui, K.; Saitoh, T.; Nishiyama, S. *Tetrahedron* **2014**, 70, 6392–6397.

<sup>75</sup> Tran, T. D.; Pham, N. B.; Fechner, G.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 516–523.

<sup>76</sup> Zhao, J.; Liu, H., *Zhongnan Yaoxue* **2013**, 11, 185-186.

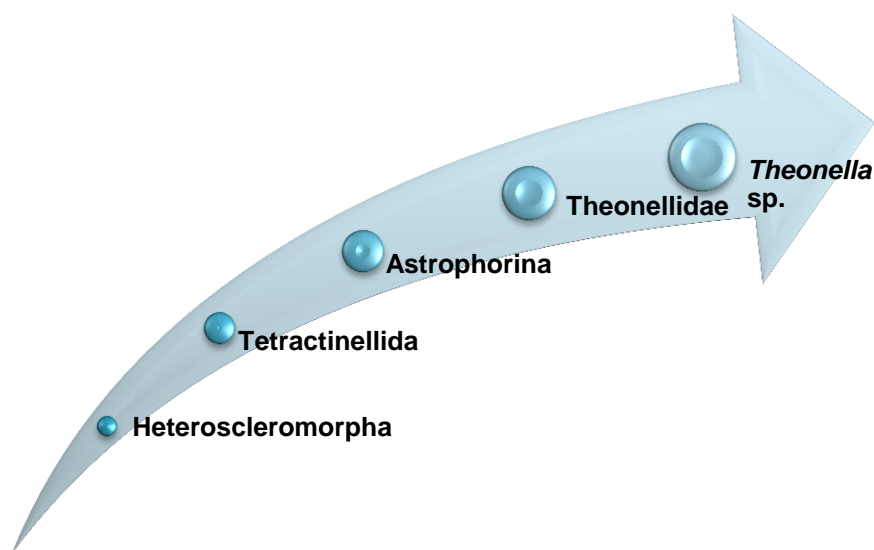




*CAPÍTULO IV*  
*THEONELLA SP.*

4. ESTUDIO DE LA ESPONJA *THEONELLA* SP.

Las esponjas del género *Theonella* (Esquema 7) pertenecen a la familia Theonellidae, suborden Astrophorina, orden Tetractinellida, subclase Heteroscleromorpha y clase Demospongiae. El ejemplar estudiado en esta ocasión no pudo clasificarse dentro de ninguna de las especies conocidas de *Theonella*. Estas esponjas poseen forma de copa con la superficie ligeramente ondulada, con numerosos poros y suelen ser de color marrón.<sup>77</sup>



Esquema 7. Clasificación de las esponjas del género *Theonella*.

Las esponjas del género *Theonella* son una fuente rica y diversa de metabolitos secundarios con actividad biológica.<sup>78</sup> Con más de 20 especies diferentes dentro del género *Theonella*, la especie *Theonella swinhoei* es sin lugar a duda la más estudiada. Aunque la mayoría de los metabolitos aislados poseen naturaleza peptídica,<sup>79</sup> se han encontrado también macrociclos,<sup>80</sup> alcaloides<sup>81</sup> y esteroides.<sup>82</sup> Estudios recientes indican que la diversidad estructural de los compuestos aislados puede deberse a la simbiosis con microorganismos.<sup>83,84</sup>

<sup>77</sup> *Systema Porifera*; Hooper, J. N. A.; Van Soest, R. W. M.; Willenz, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002.

<sup>78</sup> Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 382–431.

<sup>79</sup> Sinisi, A.; Calcinai, B.; Cerrano, C.; Dien, H. A.; Zampella, A.; D'Amore, C.; Renga, B.; Fiorucci, S.; Tagliatella-Scafati, O. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 1643–1651.

<sup>80</sup> Kashman, Y.; Carmely, S. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 511–514.

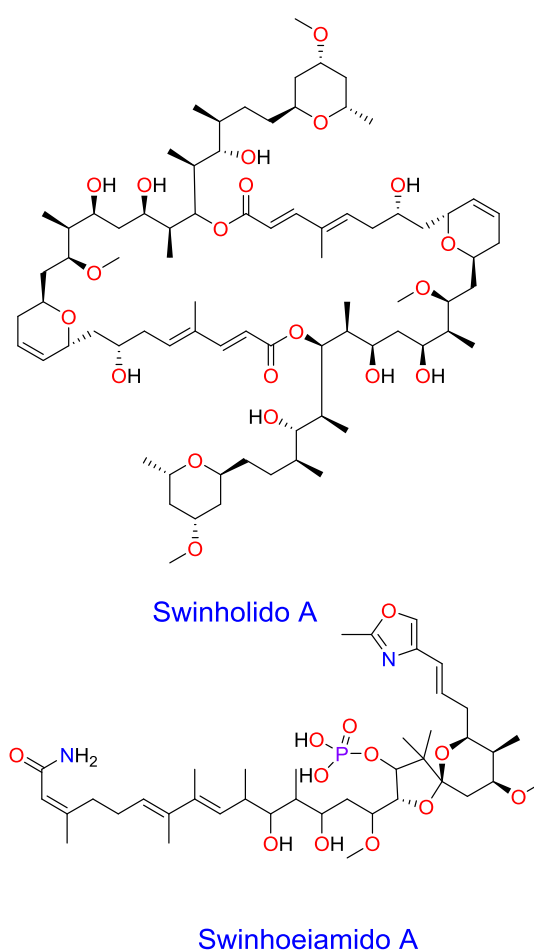
<sup>81</sup> Kobayashi, J.; Kondo, K.; Shigemori, H.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Mikami, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6680–6682.

<sup>82</sup> Umeyama, A.; Shoji, N.; Enoki, M.; Arihara, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 296–298.

<sup>83</sup> Winder, P. L.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 2643–2682.

#### 4.1. Compuestos aislados

De los 300 compuestos aislados de esponjas del género *Theonella*,<sup>85</sup> destacan principalmente los péptidos, aunque uno de los más resaltables es el macrolido swinholido A (Figura 89), publicándose su aislamiento de la esponja *Theonella swinhoei* en 1989.<sup>86</sup> Su estructura inusual presenta dos ejes de simetría y muestra una potente actividad citotóxica al actuar sobre el esqueleto de actina.<sup>87</sup> De esta misma esponja, también se aislaron compuestos relacionados con las calyculinamidas, entre las que destaca la swinhoeiamida A.<sup>88</sup>



**Figura 89.** Ejemplos de compuestos aislados de la esponja *Theonella swinhoei*.

<sup>84</sup> Wilson, M. C.; Mori, T.; Ruckert, C.; Uria, A. R.; Helf, M. J.; Takada, K.; Gernert, C.; Steffens, U. A. E.; Heycke, N.; Schmitt, S.; Rinke, C.; Helfrich, E. J. N.; Brachmann, A. O.; Gurgui, C.; Wakimoto, T.; Kracht, M.; Crusemann, M.; Hentschel, U.; Abe, I.; Matsunaga, S.; Kalinowski, J.; Takeyama, H.; Piel, J. *Nature* **2014**, 506, 58-62.

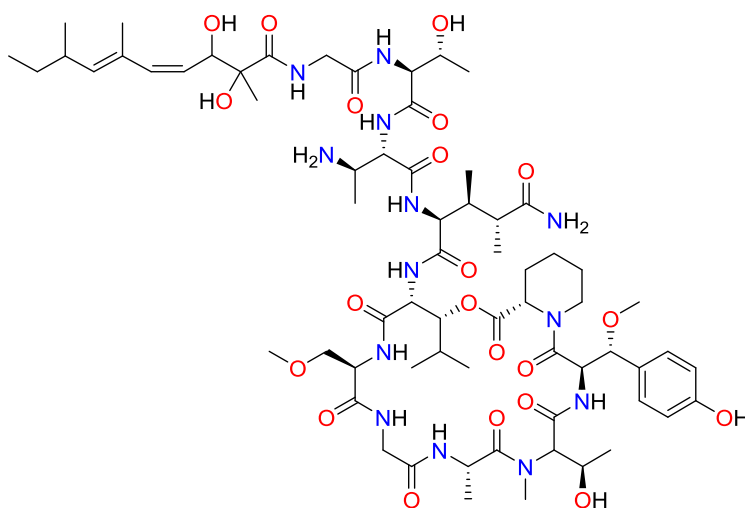
<sup>85</sup> <http://pubs.rsc.org/marinlit/>

<sup>86</sup> Kobayashi, M.; Tanaka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Kitagawa, I. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2963–2966.

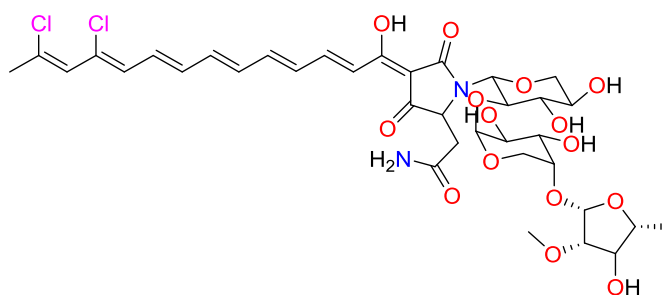
<sup>87</sup> Bubb, M. R.; Spector, I.; Bershadsky, A. D.; Korn, E. D. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 3463–3466.

<sup>88</sup> Edrada, R. A.; Ebel, R.; Supriyono, A.; Wray, V.; Schupp, P.; Steube, K.; van Soest, R.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1168–1172.

Dentro de los péptidos aislados de esponjas pertenecientes al género *Theonella*, es de destacar el depsipéptido papuamida A (Figura 90) que mostró actividad citoprotectora contra el virus HIV-1 en ensayos *in vitro*.<sup>89</sup> También se aislaron ácidos glicosídicos como los aurantosidos que poseen actividad citotóxica.<sup>90</sup>



Papuamida A



Aurantosido A

Figura 90. Ejemplos de compuestos aislados de la esponja del género *Theonella*.

<sup>89</sup> Andjelic, C. D.; Planelles, V.; Barrows, L. R. *Mar. Drugs* **2008**, 6, 528–549.

<sup>90</sup> Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Kato, Y.; Hirota, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9690–9692.

#### 4.2. *Theonella sp. cf swinhoei*

##### 4.2.1 Identificación y clasificación

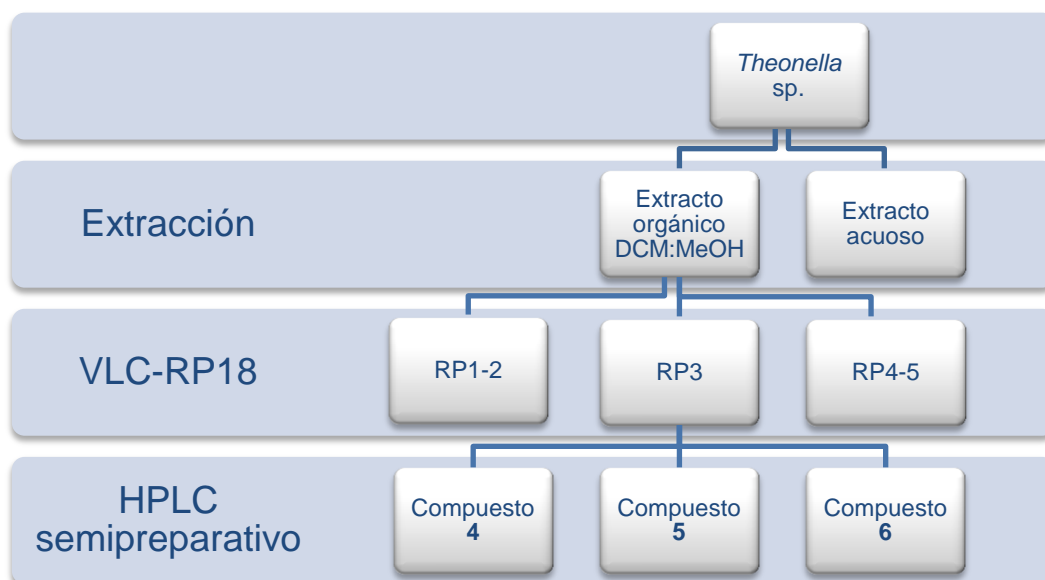


**Figura 91.** Fotografía de la esponja *Theonella sp. cf swinhoei*.

En octubre de 2011, durante la expedición científica de recolección llevada a cabo por el departamento de expediciones de PharmaMar se recolectó en Lanes (Indonesia), cerca del islote de Salanro (120° 47.798'E 01° 20.256'N), la esponja *Theonella sp. cf swinhoei* (Figura 91) mediante el uso del sistema de buceo rebreather de profundidad. La Dra. Maria Jesús Uriz Lespe del Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas clasificó taxonómicamente la esponja que se codificó como ORMA108755. Para el presente estudio químico se emplearon 77 g de los 87 g recolectados.

## 4.2.2. Extracción y fraccionamiento

La muestra se sometió al procedimiento detallado en el Capítulo 1, obteniéndose de esta forma una fracción metanólica con un peso en seco de 136 mg después de eliminar el disolvente. A continuación, esta fracción se purificó mediante HPLC semipreparativo, obteniéndose tres compuestos puros: cupolamida A<sup>91</sup> (**4**, 9.8 mg) y kumusina<sup>92</sup> ó trachycladina A<sup>93</sup> (**5**, 5.4 mg), que ya habían sido descritos anteriormente, y un tercero, compuesto **6** (9.3 mg), de estructura desconocida. Todo el proceso de aislamiento de estos compuestos se resume en el Esquema 8:



**Esquema 8.** Fraccionamiento del extracto orgánico ORMA108755 correspondiente a la esponja *Theonella sp. cf. swinhoei*.

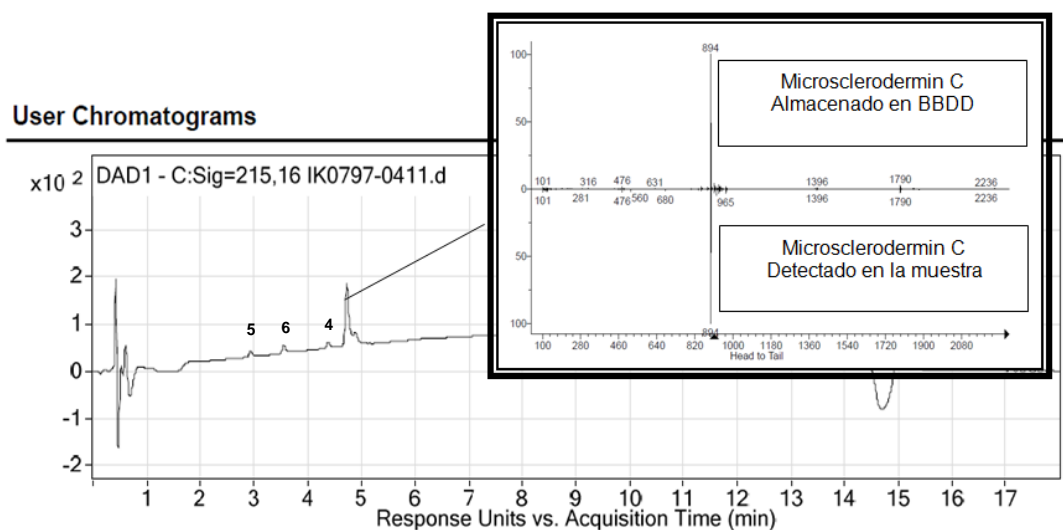
<sup>91</sup> Bonnington, L. S.; Tanaka, J.; Higa, T.; Nakao, Y.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7765–7767.

<sup>92</sup> Ichiba, T.; Nakao, Y.; Scheuer, P. J.; Sata, N. U.; Kelly-Borges, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3977–3980.

<sup>93</sup> Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4296–4298.

En el seguimiento de las etapas de fraccionamiento y purificación se empleó el estudio de su actividad biológica citotóxica *in vitro* en el panel de tres líneas celulares tumorales, tal como se explica en el Capítulo 1.

La desreplicación inicial, comentada en el Capítulo 1, mostró la presencia de tres compuestos que no se encontraban presentes en nuestra base de datos, mientras que el de tiempo de retención de 4.8 minutos desreplicaba con el compuesto microclerosdermin C<sup>94</sup> (ver Figura 92).



**Figura 92.** Desreplicación de microclerosdermin C con la base de datos de PharmaMar mediante el UPLC-TOF.

<sup>94</sup> Schmidt, E. W.; John Faulkner, D. *Tetrahedron* **1998**, 54, 3043–3056.

Microsclerodermin C (Figura 93) es un péptido cíclico con baja actividad citotóxica que, aislado de una esponja del género *Theonella*, había sido descrito en 1998 por Schimdt *et al.* Los compuestos eluidos con tiempos de retención de 2.9 min, 3.5 min y 4.4 min no mostraron coincidencias con la base de datos de la compañía, por lo que se decidió estudiarlos para determinar su estructura.

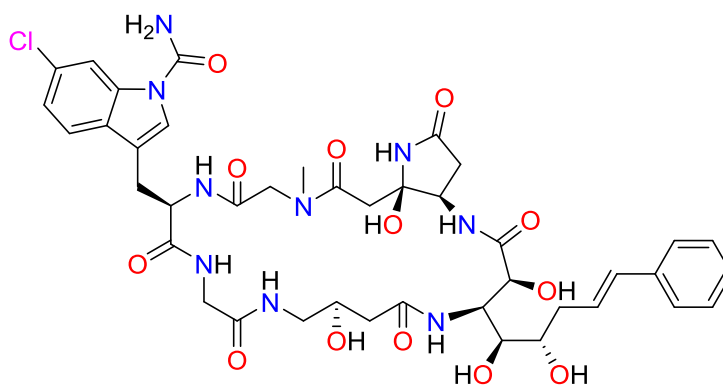


Figura 93. Microsclerodermin C.



### 4.2.3. Determinación estructural

#### 4.2.3.1. Cupolamida A (4)

El compuesto **4**, eluído con un tiempo de retención de 4.4 min en las condiciones UPLC-TOF, se obtuvo como un sólido blanco amorfo, cuyo espectro de masas de baja resolución mostró el ion  $[M+H]^+$  a  $m/z$  982. En su espectro de masas se observó además un ion a  $m/z$  902 correspondiente a una pérdida de 80 unidades de masa que se asoció a la pérdida de un grupo sulfato (Figura 94). El espectro de masas de alta resolución del ion  $[M+H]^+$  a  $m/z$  982.4664 permitió determinar su fórmula molecular como  $C_{42}H_{67}N_{11}O_{14}S$  (calc. 982.4662  $\Delta m = 0.0002$  uma) que confirma la presencia de un átomo de azufre en su estructura. El ion  $m/z$  452 se asignó al fragmento  $[M-HSO_3+2H]^{+2}$ .

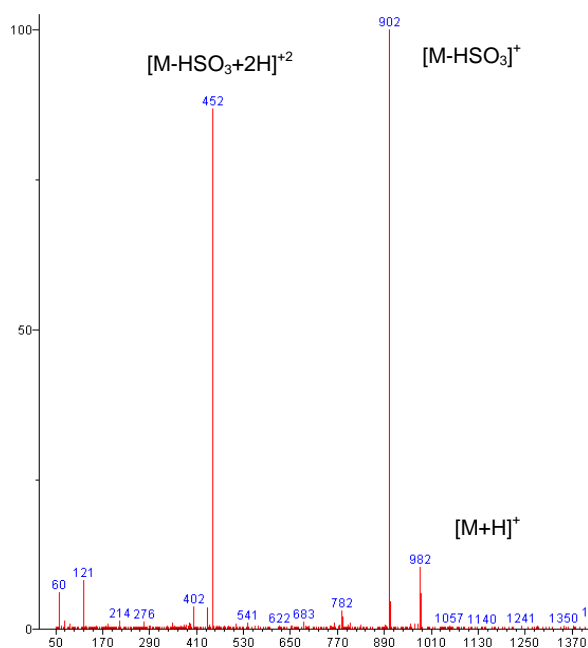


Figura 94. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **4**.

Para determinar su estructura se procedió a realizar los experimentos de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC-editado,  $^1H$ - $^1H$  COSY, HMBC,  $^1H$ - $^1H$  TOCSY (1D y 2D) y  $^1H$ - $^1H$  ROESY. De los espectros de RMN de  $^1H$  (Figura 95) y  $^{13}C$  (Figura 96), obtenidos en  $CD_3OD$  (500 MHz), se confirmó que se trataba de un péptido, ya que se observaron señales características de este tipo de compuestos, como son los carbonos carbonílicos entre 170.2-175.5 ppm, los carbonos  $\alpha$ -amino metínicos entre 3.78-4.85 ppm y los protones de amida por encima de los 7.3 ppm (Tabla 11).

Una forma sencilla de determinar e identificar los aminoácidos presentes en **4** supuso la realización del experimento selectivo 1D-TOCSY a partir de los protones NH peptídicos ó metínicos de la posición  $\alpha$  al aminoácido.

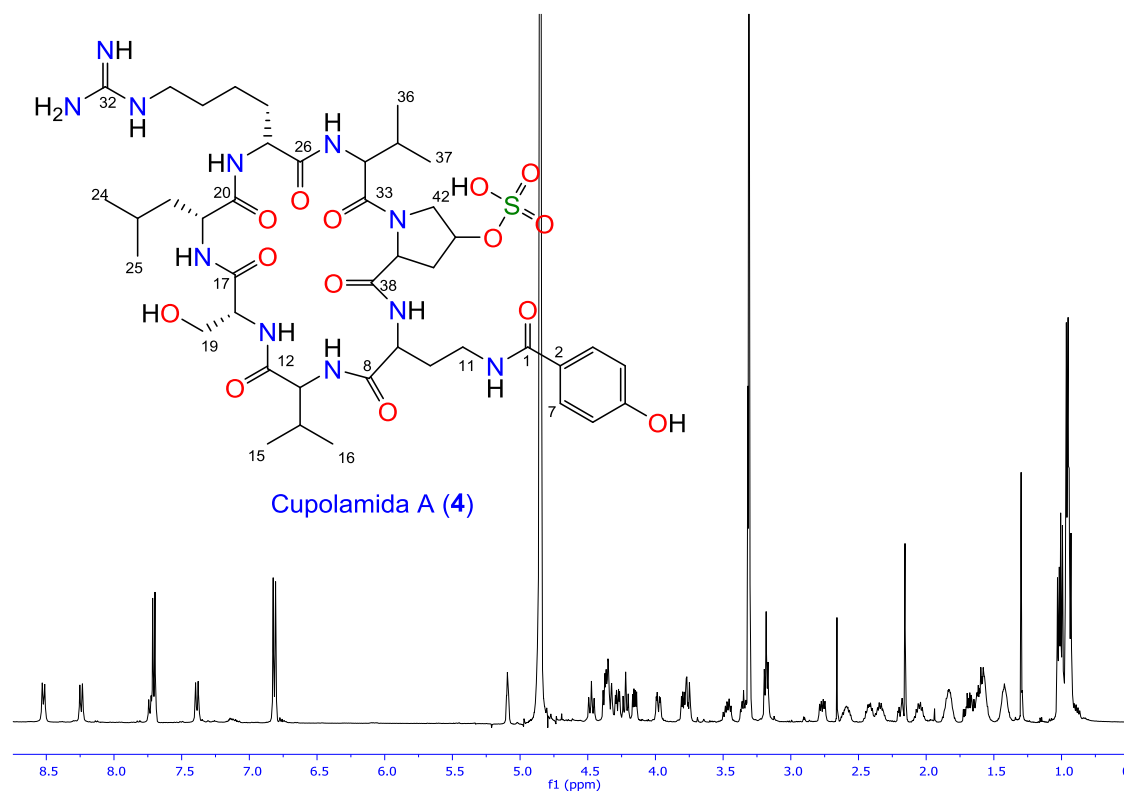


Figura 95. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **4**.

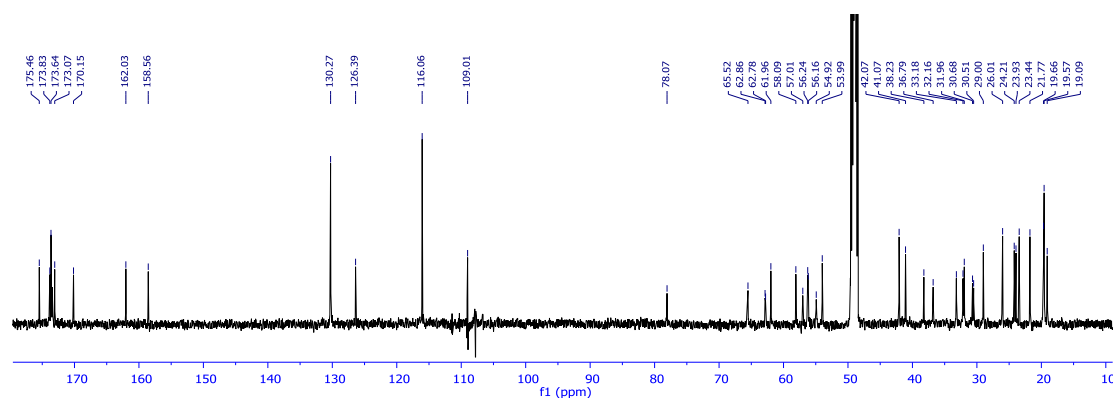
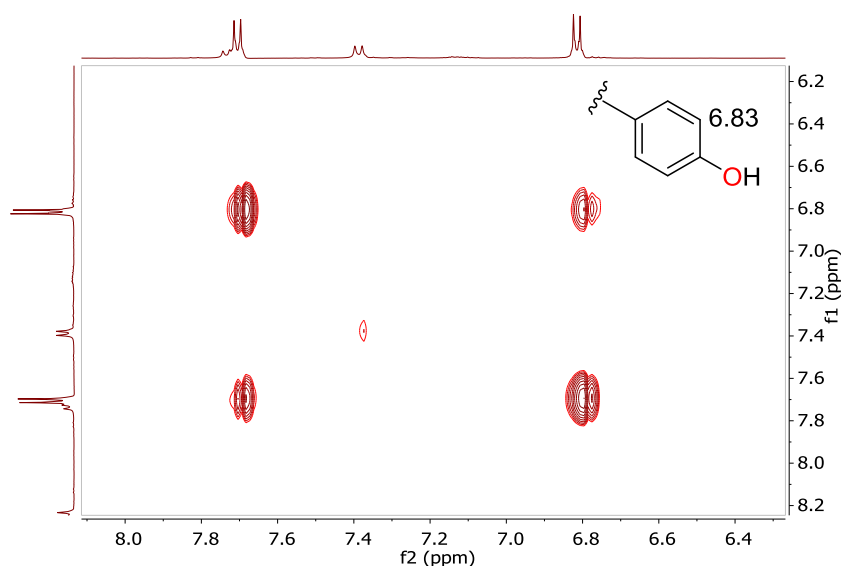


Figura 96. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **4**.

Tabla 11. Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de cupolamida A (**4**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

aa	Pos.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	aa	Pos.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
Hbz ( <i>p</i> -hidroxibenzoilo)	1	170.2		Har (homoarginina)	26	173.1	
	2	126.8			27	62.0	4.35, m
	3	130.3	7.71, d (8.7)		28	31.9	1.84, m
	4	116.0	6.83, d (8.7)				1.64, m
	5	162.0			29	23.9	1.42, m
	6	116.0	6.83, d (8.7)		30	29.0	1.58, m
	7	130.3	7.71, d (8.7)		31	42.1	3.19, dd (6.9, 6.9)
Dba (ácido 2,4-diaminobutanoico)	8	173.8			32	158.0	
	9	57.0	3.78, m	Val 2	NH 4		7.73, d (8.8)
	10	30.5	2.59, m		33	173.4	
	11	38.2	3.47, m		34	58.0	4.47, dd (10.1, 10.1)
			3.32, m		35	32.0	2.42, m
Val 1	12	173.5			36	19.0	1.02, d (6.6)
	13	62.9	4.24, dd (9.5, 9.5)		37	19.5	0.95, d (6.6)
	14	32.9	2.04, m		NH 5		7.40, d (9.5)
	15	19.5	0.95, d (6.7)	Hyp (hidroxiprolina)	38	173.7	
	16	19.7	0.92, d (6.7)		39	78.1	5.08, dd (3.8)
Ser	NH 1	--	8.25, d (9.5)		40	36.8	2.75, dd (13.5, 6.4)
	17	173.6					2.18, m
	18	54.9	4.85, m		41	54.0	4.32, m
	19	65.5	4.27, dd (11.5, 4.2)		42	56.1	4.33, m
Leu			3.74, m				3.97, dd (11.8, 3.8)
	NH 2	--	8.50, d (9.0)				
	20	175.5					
	21	56.3	4.14, dd (9.9, 4.8)				
	22	40.9	1.68, m				
			1.59, m				
	23	26.0	1.82, m				
	24	23.4	1.01, d (6.5)				
	25	19.5	0.95, d (6.5)				
	NH 3	--	8.47, d (9.9)				

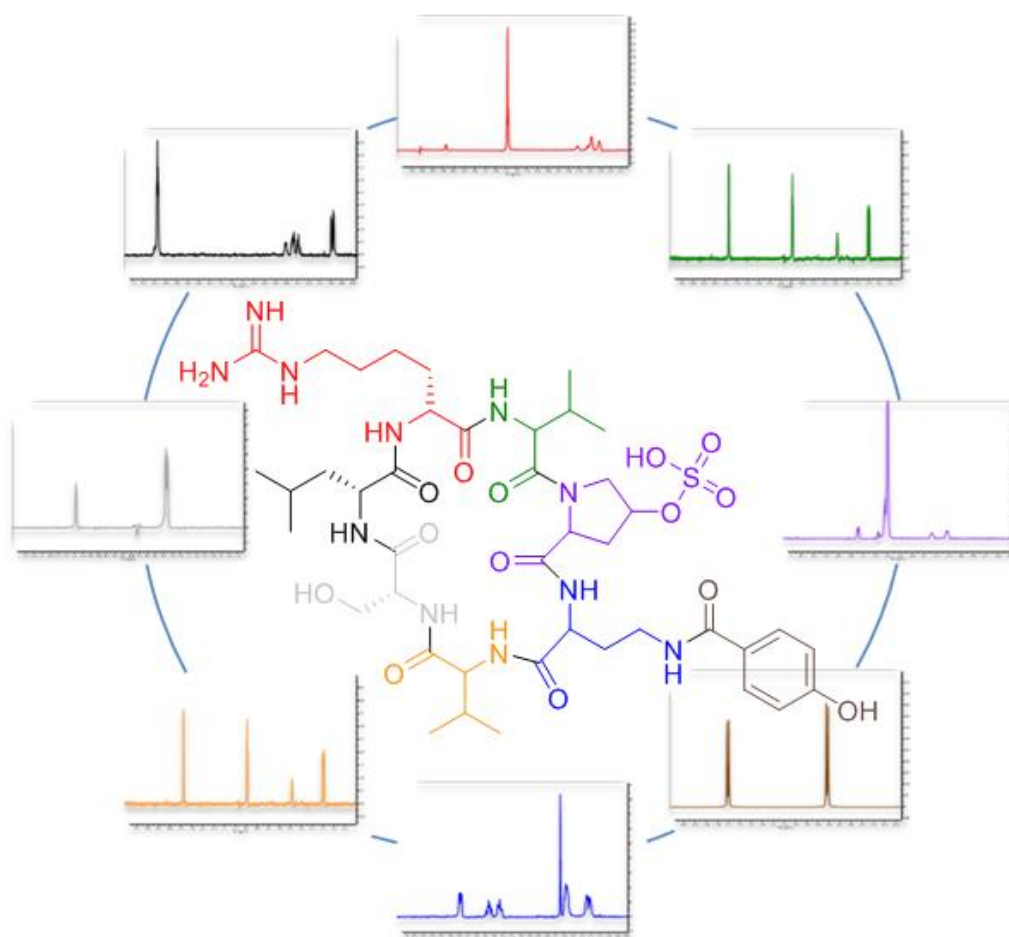
Mediante experimentos selectivos 1D-TOCSY se detectaron 8 sistemas de espines (ver Figura 98), cada uno de ellos correspondientes a un aminoácido diferente. La secuenciación de las señales obtenidas se realizó por las correlaciones observadas en el experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Además, las correlaciones observadas en este experimento muestran la presencia de un anillo bencénico *para*-sustituido (ver Figura 97), lo que sumado al bajo desplazamiento de uno de sus protones a  $\delta_{\text{H}}$  6.83, característico de una sustitución en *orto* de un grupo hidroxilo, se concluye que se trata de un fenol.



**Figura 97.** Correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de los protones del anillo bencénico *p*-sustituido de **4**.

Una vez analizados todos los sistemas de espín, se dedujo que la molécula contiene además del anillo aromático, los aminoácidos proteicos serina, leucina y dos valinas.

Con la información obtenida, se realizó una búsqueda en la base de datos MarinLit,<sup>95</sup> empleándose como perfil de búsqueda moléculas de masa molecular superior a 800 que contengan un azufre en su estructura, los 4 aminoácidos proteicos, deducidos mediante los experimentos 1D-TOCSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, y el anillo de benceno disustituido en posición *para*. Como resultado se obtuvieron un total de 8 compuestos que cumplen con los requisitos estructurales indicados. La comparación final de los 8 sistemas de espines deducidos para el compuesto **4** con la estructura de los 8 compuestos resultantes nos permitió identificar que se trataba del compuesto conocido cupolamida A.<sup>96</sup>



**Figura 98.** Espectros 1D-TOCSY de los sistemas de espines de **4**.

<sup>95</sup> <http://pubs.rsc.org/marinlit/>

<sup>96</sup> Bonnington, L. S.; Tanaka, J.; Higa, T.; Nakao, Y.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7765–7767.

Con el fin de estudiar su actividad citotóxica, el compuesto **4** se envió a ensayo al departamento de Screening. La curva dosis-respuesta obtenida a partir de su estudio a 10 concentraciones diferentes mostró unos valores de  $GI_{50}$  >11  $\mu$ M para A-549 (pulmón) y HT-29 (colon), de 3.9  $\mu$ M para MDA-MB-231 (mama) y de 2.4  $\mu$ M frente a PSN-1 (páncreas) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Actividad citotóxica del compuesto **4**.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	>10 $\mu$ M	>10 $\mu$ M	>10 $\mu$ M
HT-29	>10 $\mu$ M	>10 $\mu$ M	>10 $\mu$ M
MDA-MB-231	3.9 $\mu$ M	7.4 $\mu$ M	>10 $\mu$ M
PSN-1	2.4 $\mu$ M	3.4 $\mu$ M	5.3 $\mu$ M

## 4.2.3.2. Kumusina/trachycladina A (5)

El compuesto **5** no desreplicó con ningún compuesto de la base de datos de PharmaMar después comparar su tiempo de retención de 13.9 min y su espectro de masas de baja resolución que se muestra en la Figura 99:

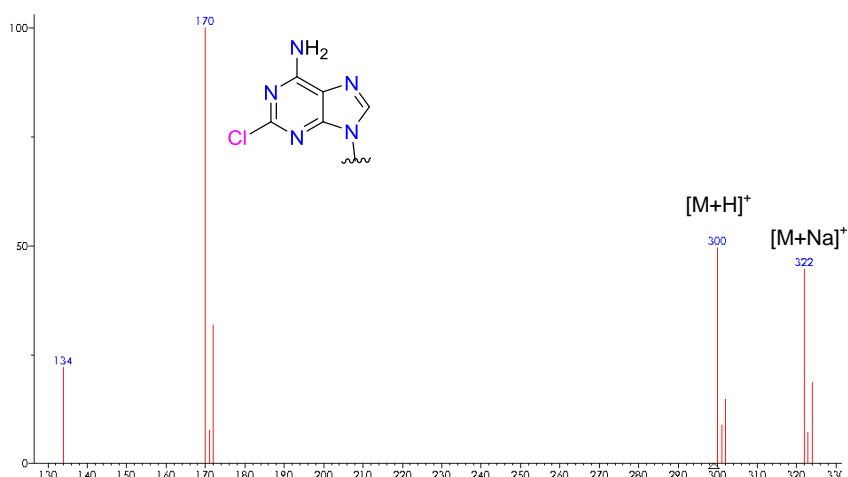


Figura 99. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **5**.

Del espectro de masas del compuesto **5** se dedujo que tenía un peso molecular de 299, ya que se observaban los iones  $[M+H]^+$  a  $m/z$  300 y  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  322. De la distribución isotópica 3:1 de los iones  $m/z$  300/302 se concluyó que la molécula contenía un átomo de cloro. El bajo peso molecular, junto con su espectro de protón (ver Figura 100), sugirió que se trataba de un nucleósido, en el que el ion de  $m/z$  a 170 se correspondía con la pérdida de un fragmento de cloro-adenina.

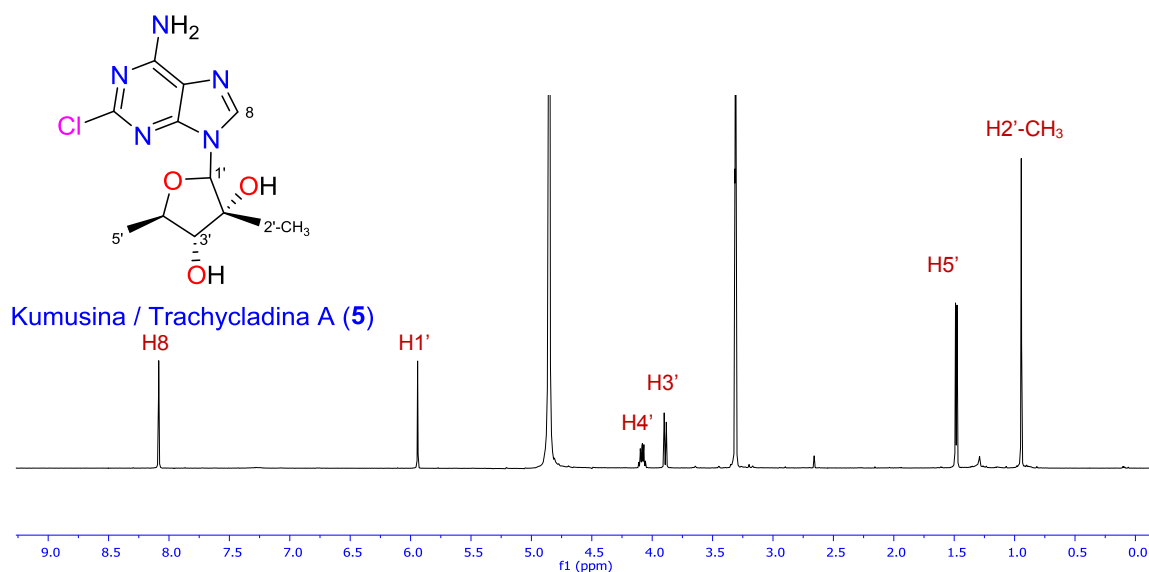


Figura 100. Espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) del compuesto **5**.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **5** de la Figura 100 se observan las señales correspondientes a un grupo metilo que resuena como un doblete a  $\delta_{\text{H}}$  0.95, a otro grupo metilo como singlete a  $\delta_{\text{H}}$  1.49 y a dos metinos unidos a oxígeno a  $\delta_{\text{H}}$  3.89 y  $\delta_{\text{H}}$  4.08. También se observan los singletes pertenecientes a un protón sobre un carbono anomérico de azúcar a  $\delta_{\text{H}}$  5.94 y a un protón metínico de heterociclo a  $\delta_{\text{H}}$  8.09.

Con los datos obtenidos, la búsqueda en MarinLit mostró que la estructura del compuesto **5** se correspondía con la de los compuestos conocidos kumusina<sup>97</sup>/trachycladina A.<sup>98</sup> Ambos compuestos, de idéntica estructura, se publicaron en 1995 con diferente nombre. La actividad citotóxica del compuesto **5** se evaluó en un panel de 4 líneas celulares: A-549 (pulmón), HT-29 (colon), MDA-MB-231 (mama) y PSN-1 (páncreas). Se obtuvieron los valores de  $\text{GI}_{50}$  >33  $\mu\text{M}$  para A-549-pulmón y HT-29-colon, de 18  $\mu\text{M}$  para MDA-MB-231-mama y de 22  $\mu\text{M}$  frente a PSN-1-páncreas (ver Tabla 13).

**Tabla 13.** Actividad citotóxica del compuesto **5**.

Línea celular	$\text{GI}_{50}$	TGI	$\text{LC}_{50}$
A549	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$
HT-29	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$
MDA-MB-231	18 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$
PSN-1	22 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$	>33 $\mu\text{M}$

<sup>97</sup> Ichiba, T.; Nakao, Y.; Scheuer, P. J.; Sata, N. U.; Kelly-Borges, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3977–3980.

<sup>98</sup> Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4296–4298.



## 4.2.3.3. Ácido lanesoico (6)

Se obtuvo como un aceite incoloro con una rotación óptica específica de  $[\alpha]_D^{25} 8.0$  ( $c$  0.01, MeOH). Su espectro de infrarrojo presentó unas bandas máximas de infrarrojo a  $\nu_{\max}$  3374, 1677, 1369, 1202, 1153, 1085 y 1039  $\text{cm}^{-1}$ . Su espectro de ultravioleta-visible mostró máximos de absorción (MeOH) a  $\lambda_{\max}$  204, 251 y 283 nm.

En el espectro de masas de alta resolución HRESITOFMS de 6 se observó el ión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  316.1657, correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{17}H_{20}N_3O_3$  (calc. para  $C_{17}H_{21}N_3O_3$   $m/z$  316.1656  $\Delta m = 0.0001$  uma), el cual requería nueve grados de insaturación. El espectro de masas de baja resolución mostró, además del ión  $[M+H]^+$ , un fragmento a  $m/z$  288 correspondiente a la pérdida de un grupo CHO (ver Figura 101).

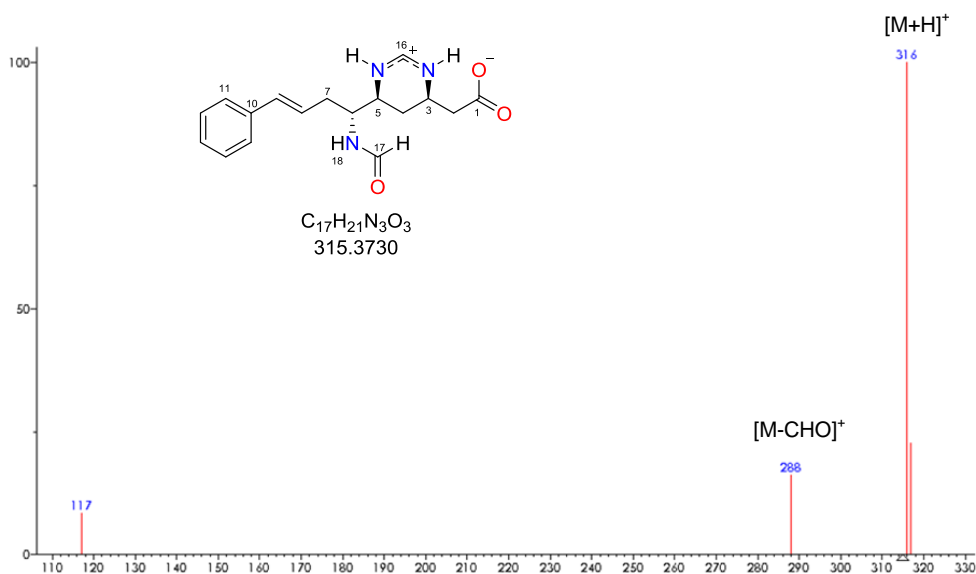


Figura 101. Espectro de masas de baja resolución del compuesto 6.

La determinación de la estructura se estableció mediante espectrometría de masas de alta y baja resolución junto con espectroscopia de RMN momo y bidimensional. De la combinación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Figura 102),  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 103) y HSQC (Figura 104), se dedujo que el compuesto **6** contenía dos grupos carbonilo: un ácido carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  173.6) y un grupo formamido ( $\delta_{\text{H}}$  8.19 /  $\delta_{\text{C}}$  164.4), un metino ( $\delta_{\text{H}}$  7.88 /  $\delta_{\text{C}}$  153.0), un benceno monosustituido [ $\delta_{\text{C}}$  127.2 (C11/C15), 128.5 (C13), 129.6 (C12/C14), y 138.5 (C10),  $\delta_{\text{H}}$  7.15 (H13), 7.23 (H12/H14) y 7.31 (H11/H15)], un doble enlace disustituido ( $\delta_{\text{H}}$  6.14 /  $\delta_{\text{C}}$  125.5 y  $\delta_{\text{H}}$  6.49 /  $\delta_{\text{C}}$  134.9), tres carbonos metínicos  $\text{sp}^3$  unidos a heteroátomos ( $\delta_{\text{H}}$  4.19 /  $\delta_{\text{C}}$  51.3,  $\delta_{\text{H}}$  3.73 /  $\delta_{\text{C}}$  53.3 y  $\delta_{\text{H}}$  3.94 /  $\delta_{\text{C}}$  47.6) y tres carbonos metilénicos ( $\delta_{\text{H}}$  2.56;2.40 /  $\delta_{\text{C}}$  34.8,  $\delta_{\text{H}}$  2.33;1.60 /  $\delta_{\text{C}}$  28.9 y  $\delta_{\text{H}}$  2.71;2.62 /  $\delta_{\text{C}}$  38.6). En su espectro de RMN- $^1\text{H}$  se observan además dos señales correspondientes a protones intercambiables ( $\delta_{\text{H}}$  8.33 y 9.62) cuando se utiliza como disolvente  $\text{CD}_3\text{OH}$  y que se convierten en tres ( $\delta_{\text{H}}$  9.84, 8.75 y 7.52) cuando se emplea  $\text{CD}_3\text{CN}$  (ver Figura 113). Todos estos desplazamientos químicos se recogen en la Tabla 14.

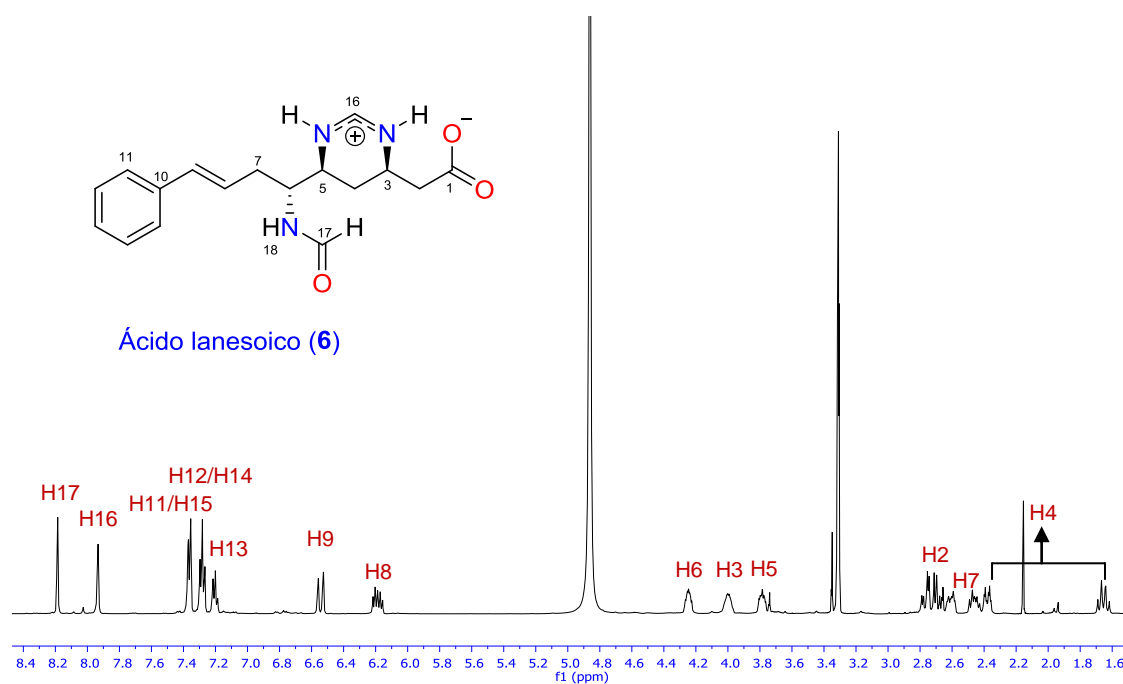


Figura 102. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 6.

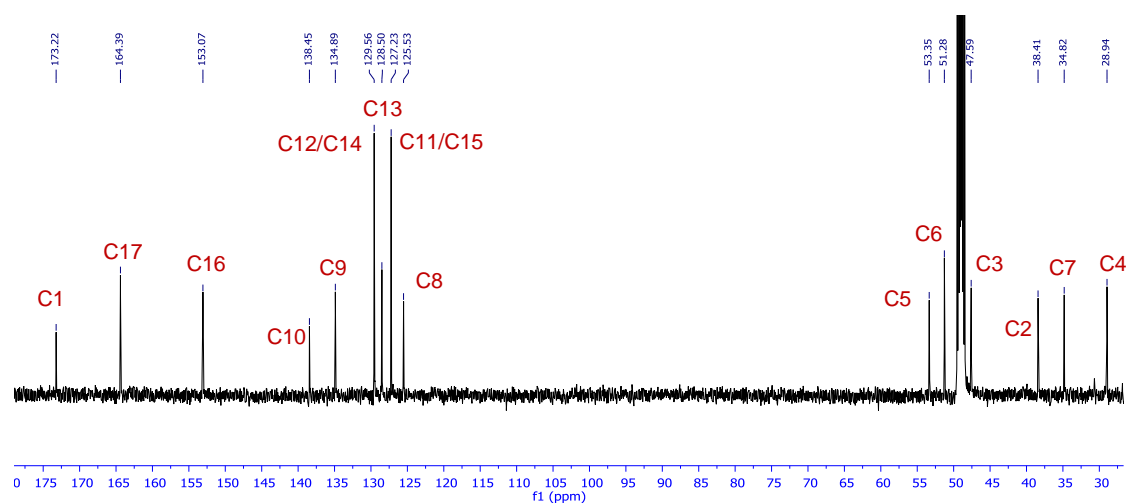
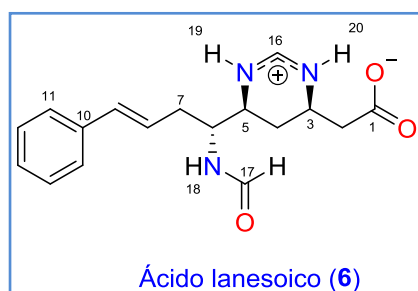


Figura 103. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 6.

**Tabla 14.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del ácido lanesoico (**6**) ( $\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$  o  $\text{CD}_3\text{CN}^{\text{b}}$ ).

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz) <sup>o</sup>
<b>1</b>	173.6, C		
<b>2</b>	38.6, CH <sub>2</sub>	2.71, dd (17.2, 5.5) 2.62, dd (17.2, 7.9)	2.71, m
<b>3</b>	47.6, CH	3.94, m	3.91, m
<b>4</b>	28.9, CH <sub>2</sub>	2.33, ddd (13.4, 3.8, 3.8) 1.60, ddd (13.4, 11.2, 11.2)	2.22, m 1.57, m
<b>5</b>	53.3, CH	3.73, ddd (11.1, 6.6, 3.8)	3.74, m
<b>6</b>	51.3, CH	4.19, ddd (8.6, 6.6, 4.9)	4.24, m
<b>7</b>	34.8, CH <sub>2</sub>	2.56, ddd (13.9, 5.5, 4.9) 2.40, ddd (15.8, 8.6, 5.5)	2.56, m
<b>8</b>	125.5, CH	6.14, ddd (15.8, 8.6, 5.5)	6.19, dt (15.9, 7.1)
<b>9</b>	134.9, CH	6.49, d (15.8)	6.52, d (15.9)
<b>10</b>	138.5, C		
<b>11</b>	127.2, C	7.31, d (7.6)	7.39, d (7.0)
<b>12</b>	129.6, C	7.23, d (7.6, 7.6)	7.32, dd (7.0, 7.0)
<b>13</b>	128.5, CH	7.15, d (7.6)	7.15, dd (7.0, 7.0)
<b>14</b>	129.6, C	7.23, dd (7.6, 7.6)	7.32, dd (7.0, 7.0)
<b>15</b>	127.2, C	7.31, d (7.6)	7.39, d (7.0)
<b>16</b>	153.0, CH	7.88, s	7.88, s
<b>17</b>	164.4, CH	8.19, d (2.7)	8.16, s
<b>18</b>	NH	8.33, d (9.2)*	7.52, d (9.4)
<b>19</b>	NH	9.62, bs*	9.84, bs
<b>20</b>	NH		8.75, bs

\*En  $\text{CD}_3\text{OH}$

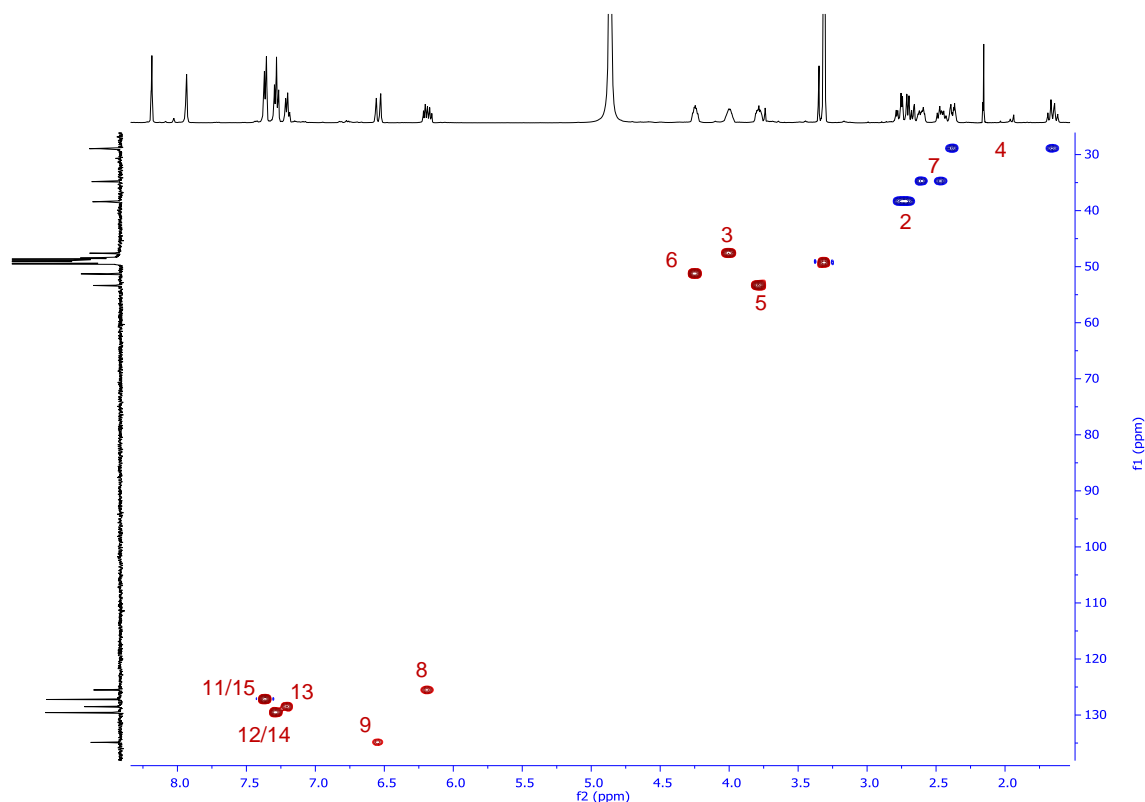


Figura 104. Espectro gHSQC (CD<sub>3</sub>OD) del compuesto **6**.

El análisis de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, indicaron la presencia de dos sistemas de espines diferentes. El primero **A** formado por los protones H11/H15 ( $\delta_{\text{H}}$  7.31), H12/H14 ( $\delta_{\text{H}}$  7.23) y H13 ( $\delta_{\text{H}}$  7.15), que conforman un anillo bencénico monosustituido, y el segundo **B**, constituido por una cadena lineal formada por los protones H9 ( $\delta_{\text{H}}$  6.49), H8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.14), H7 ( $\delta_{\text{H}}$  2.56;2.40), H6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.19), H5 ( $\delta_{\text{H}}$  3.73), H4 ( $\delta_{\text{H}}$  2.33;1.60), H3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.94) y H2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.71;2.62) (ver Figura 105).

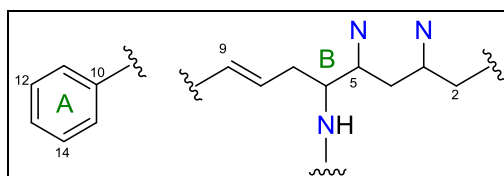


Figura 105. Fragmentos obtenidos a partir de los sistemas de espines deducidos de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y COSY del compuesto **6**.

Los desplazamientos químicos de los carbonos C3 ( $\delta_C$  47.6), C5 ( $\delta_C$  53.3) y C6 ( $\delta_C$  51.3), indicaron que estaban unidos a nitrógenos. La constante de acoplamiento entre H8 ( $\delta_H$  6.14) y H9 ( $\delta_H$  6.49) ( $J = 15.8$  Hz) indicó que se trataban de dos protones de un doble enlace con configuración *trans*.

La conexión entre los sistemas de espines **A** y **B** se determinó mediante las correlaciones a larga distancia observadas entre H11 ( $\delta_H$  7.31) y C9 ( $\delta_C$  134.9) en el experimento bidimensional HMBC de **6** (Figura 106). Los carbonos cuaternarios se unieron a través de correlaciones HMBC entre H12/H14 ( $\delta_H$  7.23) y C10 ( $\delta_C$  138.5), y entre H3 ( $\delta_H$  3.94) y C1 ( $\delta_C$  173.6). El grupo formamida ( $\delta_C$  164.4) se situó en C17 por la correlación HMBC observada entre H17 ( $\delta_H$  8.19) y C6 ( $\delta_C$  51.3). Finalmente, la presencia de un anillo de tetrahidropirimidina se determinó a partir del desplazamiento químico a  $\delta_H$  7.88/ $\delta_C$  153.3 en  $CD_3CN$ , característico de un grupo metino rodeado de dos átomos de nitrógeno, de la correlación HMBC de dicho protón con los carbonos C3 ( $\delta_C$  47.6) y C5 ( $\delta_C$  53.3) y de la correlación  $^1H$ - $^1H$  COSY entre los protones H16 y el del NH a 9.84 ppm.

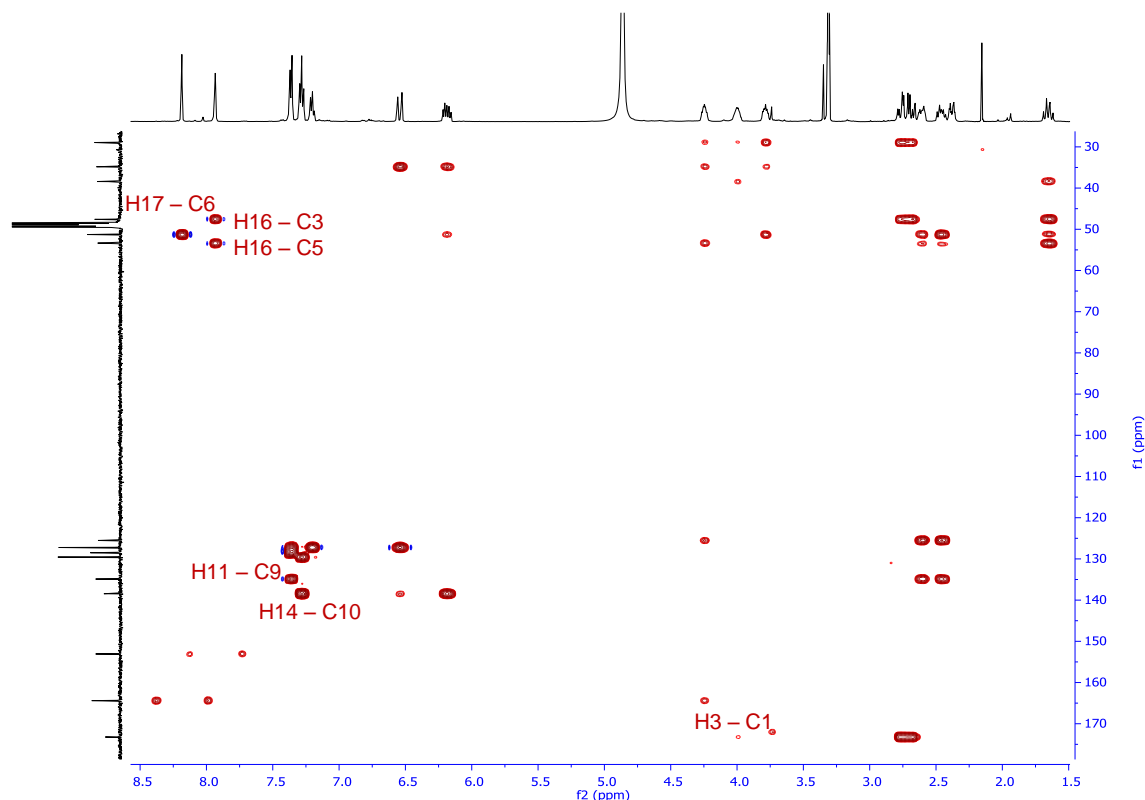


Figura 106. Espectro HMBC (en  $CD_3OD$ , 500 MHz) del compuesto **6**.

Una vez conectados todos los fragmentos, se propuso la estructura plana para el compuesto **6** indicada en la Figura 107:

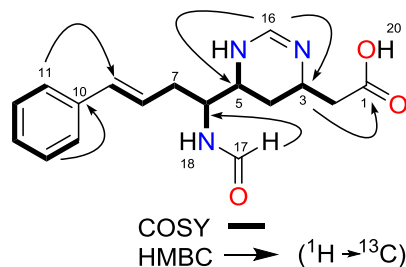


Figura 107. Estructura plana del compuesto **6**.

Todas las correlaciones observadas en el experimento bidimensional HMBC, se reflejan en forma de esquema en la Figura 108:

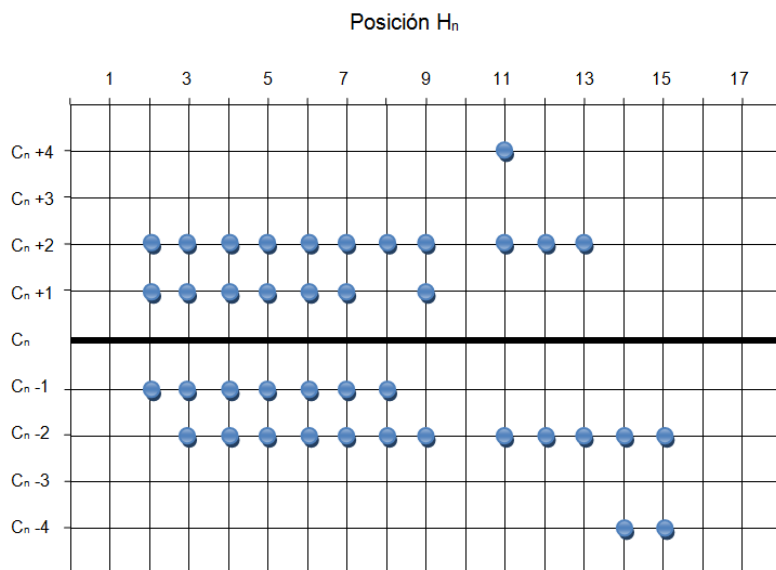


Figura 108. Correlaciones HMBC observadas del compuesto **6**.

La estereoquímica relativa del anillo de tetrahidropirimidina se definió mediante una combinación del análisis de las constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , del estudio conformacional mediante cálculos de mecánica molecular y de las correlaciones observadas en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY. En el anillo de tetrahidropirimidina se pudo identificar los dos protones diasterotópicos  $\text{H4}'$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.33) y  $\text{H4}''$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.60), siendo el más desapantallado el que ocupa la posición *pseudoecuatorial* y el más apantallado la *pseudoaxial*. El protón  $\text{H4}''$  se observó en el espectro de RMN como un ddd con constantes de acoplamiento de 13.4, 11.2 y 11.2 Hz, mientras que el  $\text{H4}'$  como un ddd con constantes de 13.4, 3.8 y 3.8 Hz. La  $J_{\text{H-H}}$  geminal entre  $\text{H4}'$  y  $\text{H4}''$  se asignó al valor de 13.4 Hz, por lo que las constantes de 11.2 y 3.8 Hz son debidas al acoplamiento con los dos metinos adyacentes. Las constantes de acoplamiento de 11.2 Hz del protón *pseudoaxial*  $\text{H4}''$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.60) con los metinos  $\text{H3}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.94) y  $\text{H5}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.73), correspondientes a acoplamientos *pseudoaxial-pseudoaxial*, indicaron que estos protones se encuentran en posición *antiperiplanar*. El valor pequeño de 3.8 Hz de las constantes de acoplamiento del protón  $\text{H4}'$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.33) con los protones  $\text{H3}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.94) y  $\text{H5}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.73) indican que este protón se encuentra en disposición *pseudoecuatorial*.

Una vez analizadas las  $^3J_{\text{H-H}}$  de los protones del anillo de tetrahidropirimidina, se pasó a estudiar los ROEs de los protones  $\text{H3}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.94) y  $\text{H5}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.73) observados en el experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY. La presencia de una interacción ROE entre ellos indicó que ambos protones están en la misma cara del ciclo, en posiciones *pseudoaxial* (ver Figura 109).



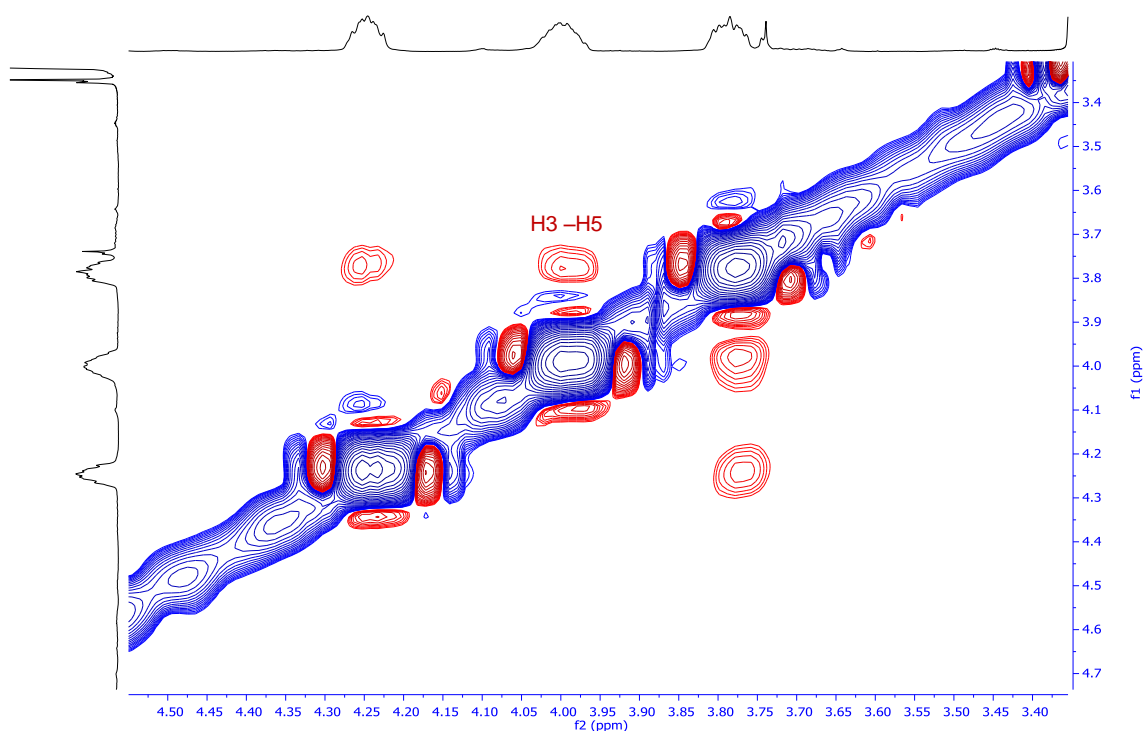


Figura 109. ROESY. Ampliación de la zona de las correlaciones clave del compuesto 6.

El valor grande de 11.2 Hz de las constantes de acoplamiento entre H3 y H4" y entre H5 y H4", junto con los ROEs observados, fijó estos 3 protones en posiciones *anti* en el anillo que se encuentra en una conformación semisilla (Figura 110).

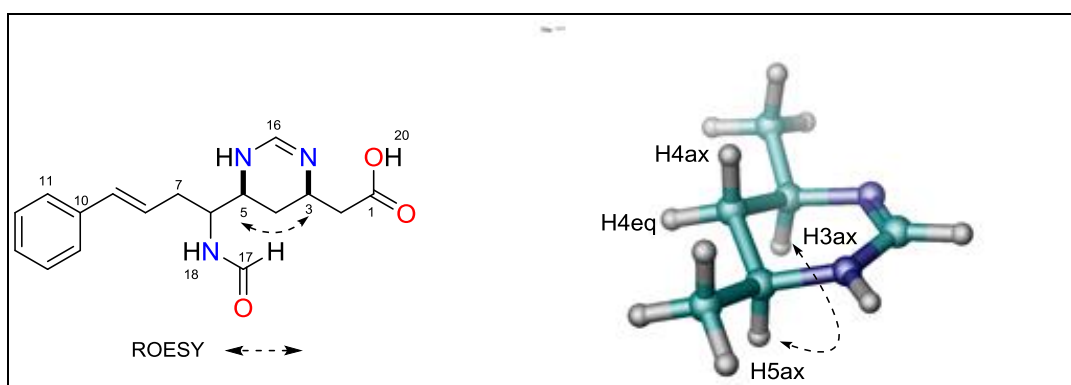
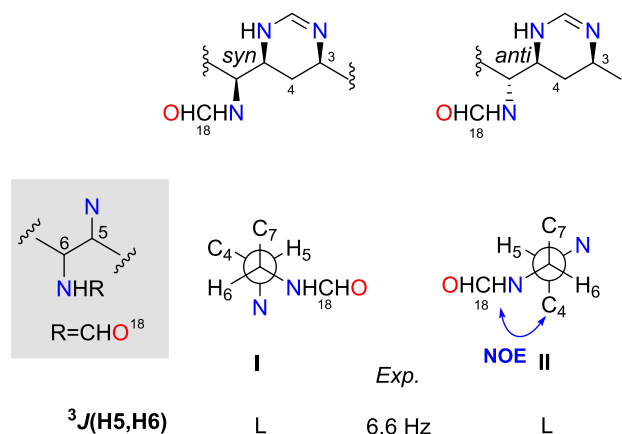


Figura 110. Correlaciones seleccionadas del experimento ROESY del compuesto 6.

La determinación de la configuración relativa del centro quiral en C6 respecto a los carbonos quirales del anillo de tetrahidropirimidina fue llevada a cabo por la Dra. María Blanco Méndez<sup>99</sup> y viene reflejada, con todo detalle, en su tesis doctoral dirigida por el Dr. Jaime Rodríguez González y el Dr. Carlos Jiménez González del departamento de Química, Área de Química Orgánica de la Universidad da Coruña. No es objeto de esta tesis explicar pormenorizadamente este estudio, pero se presenta a modo resumen como se resolvió la estereoquímica relativa de los centros quirales C6 y C5, aplicando la metodología de Murata<sup>100</sup> y cálculos computacionales por DFT.<sup>101</sup>

Sobre el sistema formado por C5 y C6 se estudiaron las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares, con el fin de identificar el rotámero mayoritario en equilibrio. El valor de 6.6 Hz de la constante homonuclear  $^3J(\text{H5}/\text{H6})$  se consideró grande al tratarse de un sistema sustituido por nitrógenos,<sup>102</sup> lo que indicó una disposición antiperiplanar para esos protones. Teniendo en cuenta que la ROE observada entre H4 y H18 (NHR) sólo es compatible con una disposición *anti*, la estereoquímica relativa entre C5 y C6 tiene que ser la descrita en la Figura 111.



**Figura 111.** Confórmeros compatibles con el análisis de las constantes de acoplamiento *anti* del compuesto **6** tomado de la tesis doctoral de la Dra. María Blanco Méndez.

<sup>99</sup> Blanco, M. (2015). Estudio de constantes de acoplamiento en sistemas acíclicos quirales con átomos de nitrógeno. UDC, A Coruña..

<sup>100</sup> Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.

<sup>101</sup> Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 643–660.

<sup>102</sup> A. Ardá, M. I. Nieto, M. Blanco, C. Jiménez and J. Rodríguez, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 7227–7232.

Para confirmar la estereoquímica relativa de los centros C5 y C6 se realizó un estudio por modelización molecular de los dos posibles diastereoisómeros, que conlleva la comparación de los desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  experimentales con los obtenidos mediante cálculos DFT.

Mediante el uso del programa MACROMODEL, se realizó una búsqueda conformacional con una ventana energética de 3.0 Kcal/mol, obteniéndose 68 conformeros para el diastereoisómero *sin* y 52 para el *anti*. Una vez calculadas las energías teniendo en cuenta las vibraciones y la presencia de “shutter points” para cada uno de ellos utilizando el funcional B3LYP/6-31+G(d,p) para la energía-frecuencia (en fase gas), se calcularon los desplazamientos químicos con el funcional MPW1PW91/6-311++G(2d,p) en disolución (acetonitrilo).

Los desplazamientos teóricos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos se compararon con los experimentales mediante el estudio de la probabilidad DP4,<sup>103</sup> obteniéndose una probabilidad del 100% para el isómero C5/C6 *anti* frente al C5/C6 *sin*. Además, la comparación de los datos computacionales con los experimentales analizados con el método mejorado DP4+, recientemente publicado por Sarotti y col.,<sup>104</sup> señaló al isómero C5/C6 *anti* con una probabilidad del 99% frente al C5/C6 *sin*.

<sup>103</sup> Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12946-12959. Web applet: <http://www.jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4>

<sup>104</sup> Grimblat, N.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 12526-12534.

De este modo, mediante la aplicación de método de Murata como la realización de cálculos computacionales analizados por DP4 y DP4+ coincidieron en la determinación de la estereoquímica relativa de los centros C5/C6 como *anti*. Por tanto, la configuración relativa completa del compuesto **6** resulto ser  $3R^*,5S^*,6R^*$ .

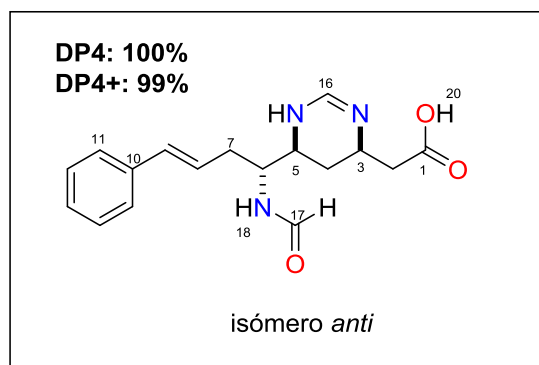
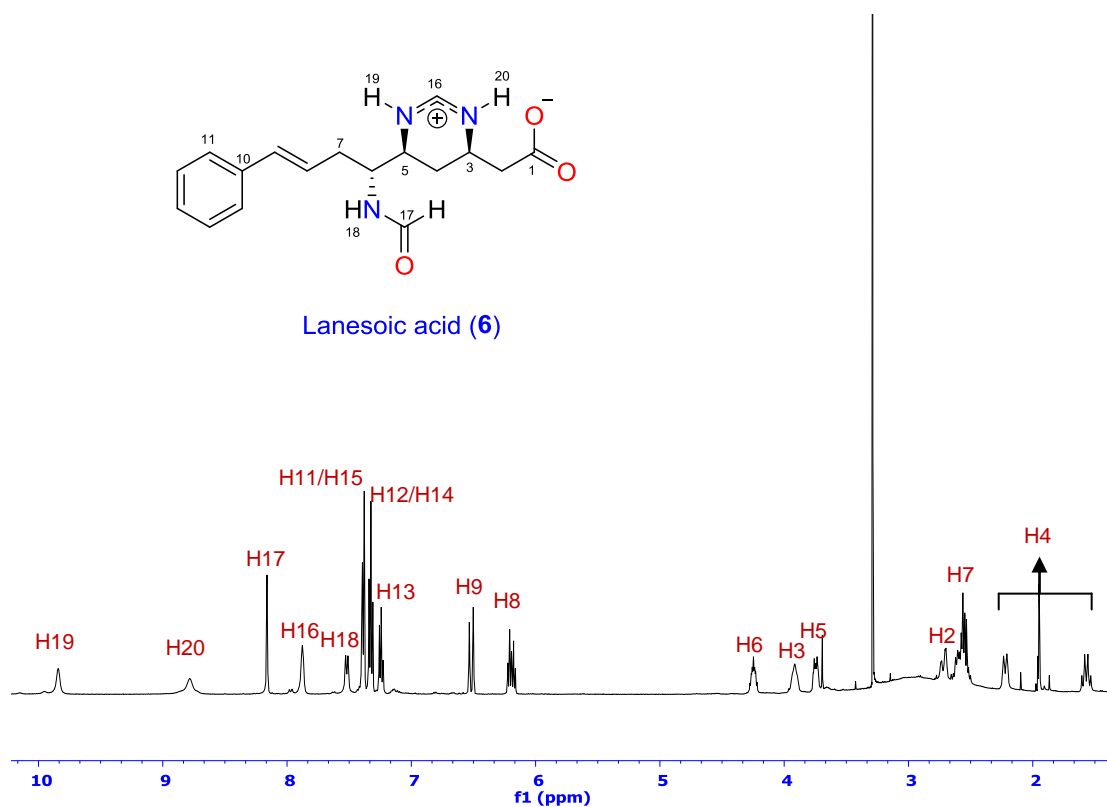


Figura 112. Isómeros *sin* y *anti* del compuesto **6**.

La estructura zwitteriónica del compuesto **6** se propuso a partir de los datos obtenidos de los experimentos de RMN en  $CD_3CN$ . En su espectro de  $^1H$  de RMN (ver Figura 113) se observan las señales correspondientes a tres protones, **H18** ( $\delta_H$  7.52), **H19** ( $\delta_H$  9.84) y **H20** ( $\delta_H$  8.75) que pudieron ser asignados a partir de las correlaciones observadas en el experimento bidimensional  $^1H$ - $^1H$  COSY (Figura 114) entre **H18** ( $\delta_H$  7.52) con **H6** ( $\delta_H$  4.24) y **H17** ( $\delta_H$  8.16) y las observadas entre **H19** ( $\delta_H$  9.84) y **H20** ( $\delta_H$  8.75) con **H16** ( $\delta_H$  7.88).



**Figura 113.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto 6.

Por otro lado, el experimento ROESY (Figura 115) mostró correlaciones entre los protones H20 ( $\delta_{\text{H}}$  8.75) con H3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.91) y H19 ( $\delta_{\text{H}}$  9.84) con H5 ( $\delta_{\text{H}}$  3.74), H17 ( $\delta_{\text{H}}$  8.16) y H18 ( $\delta_{\text{H}}$  7.52), lo que indicó la proximidad del grupo formamida al anillo de tetrahidropirimidina (Figura 115).

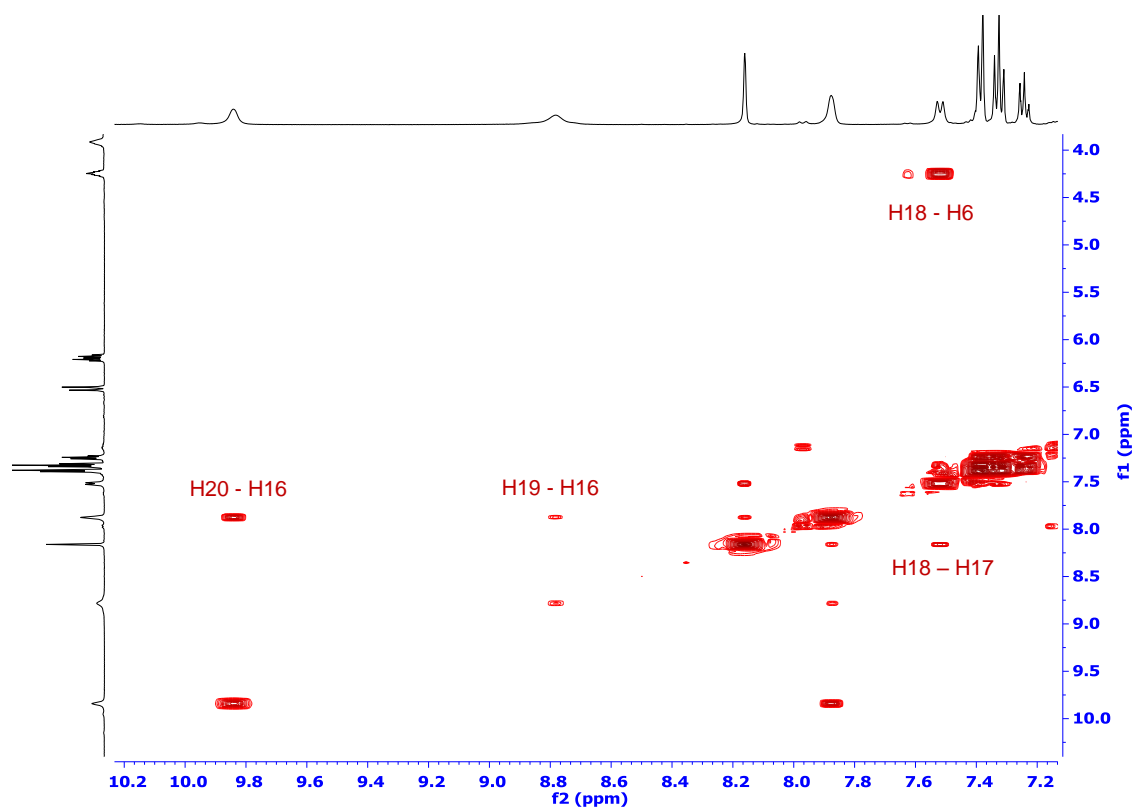


Figura 114. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) clave para el compuesto 6.

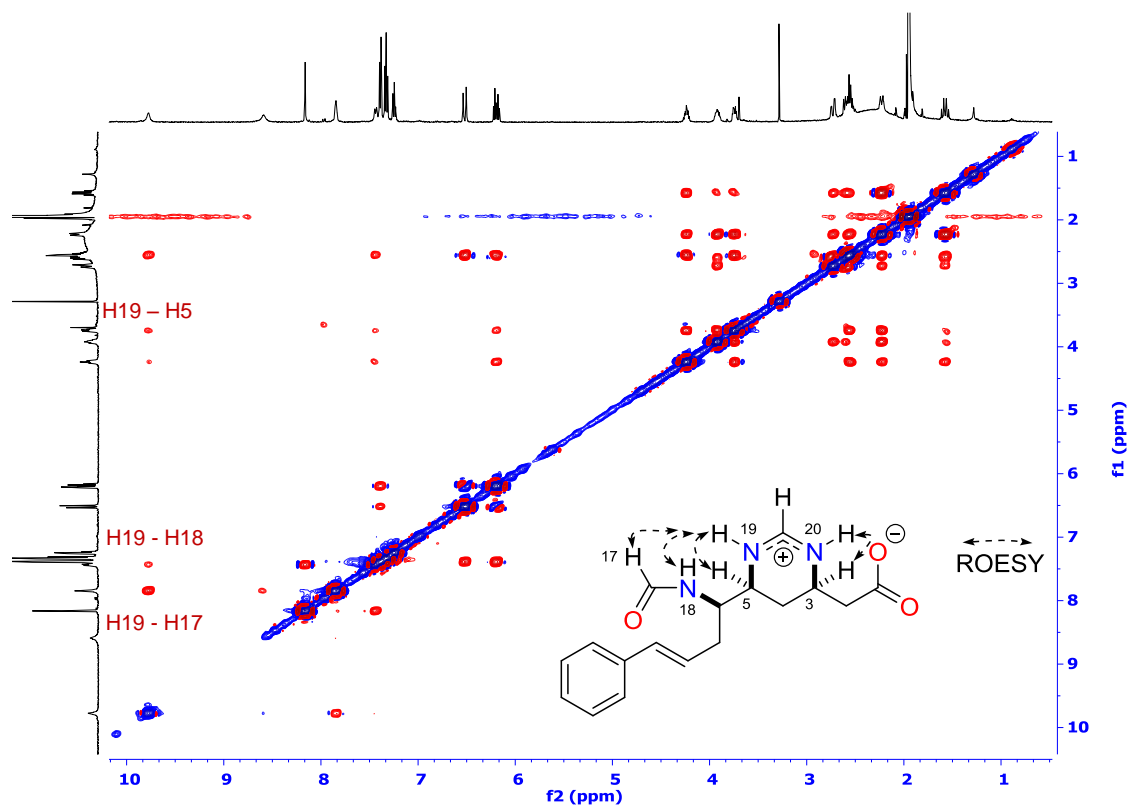


Figura 115. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto 6.

La naturaleza zwitteriónica del compuesto **6** se demostró claramente por los desplazamientos químicos de nitrógeno similares observados en el experimento  $^{15}\text{N}$ -HSQC ( $\delta_{\text{N}}$  122.3.4/  $\delta_{\text{H}}$  8.75 y  $\delta_{\text{N}}$  119.4/  $\delta_{\text{H}}$  9.84 ppm), y por lo tanto una hibridación análoga. El experimento de  $^{15}\text{N}$ -HMBC, adquirido con una  $J$  de 10 Hz, mostró una correlación entre el protón H16 ( $\delta_{\text{H}}$  7.88) con ambos nitrógenos. Por último, la banda de absorción IR a  $1677\text{ cm}^{-1}$  es característica de la existencia de la forma zwitteriónica en estado sólido.

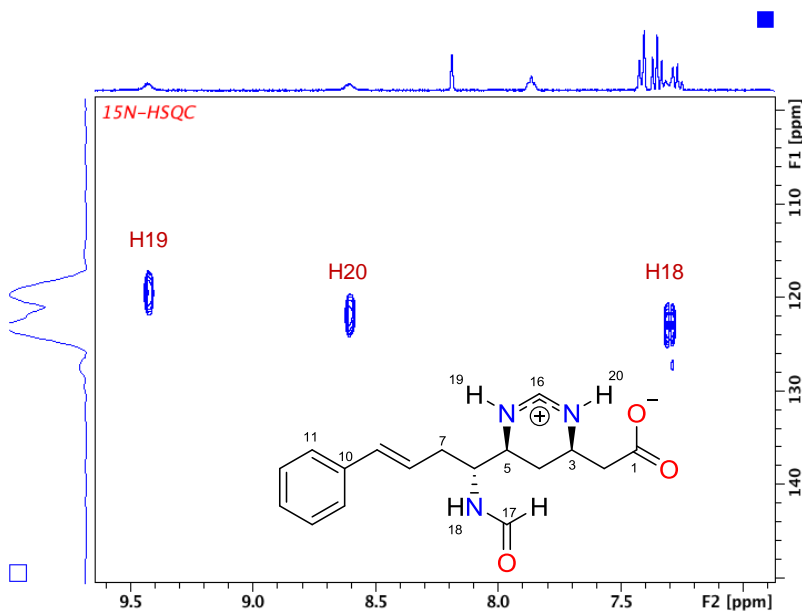


Figura 116. Espectro de RMN de  $^{15}\text{N}$ -HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **6**.

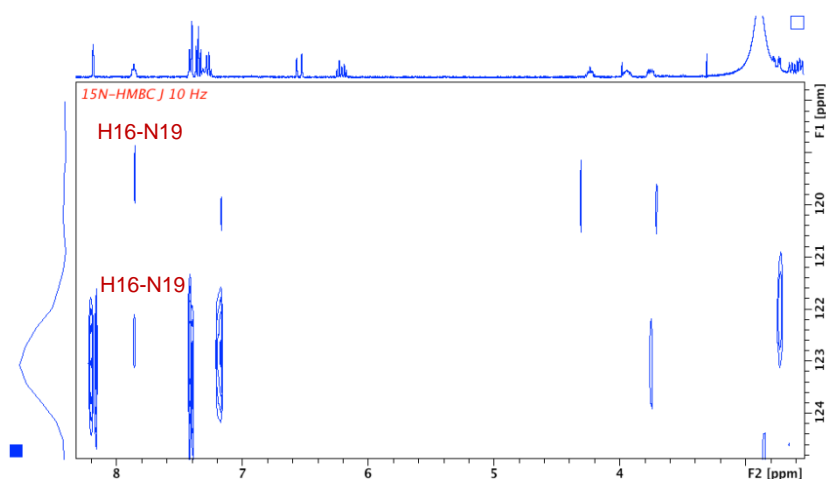
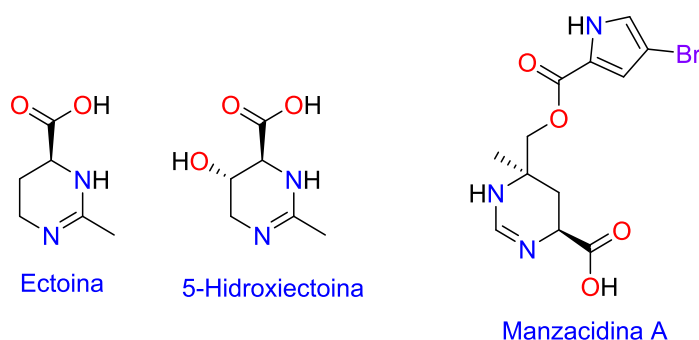


Figura 117. Espectro de RMN de  $^{15}\text{N}$ -HMBC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **6**.

Aunque el anillo de 1,4,5,6-tetrahidropirimidina ya había sido descrito en productos naturales como la ectoína, compuesto obtenido de la bacteria del género *Ectothiorhodospira*,<sup>105</sup> la 5-hidroxiectoína, producida por *Streptomyces parvulus*,<sup>106</sup> así como en las manzacidinas, aisladas de la esponja *Hymeniacidon* sp.<sup>107</sup> (Figura 118), es la primera vez que se observa una estructura zwitteriónica en este tipo de estructuras. La naturaleza zwitteriónica se puede ver favorecida por la formación de un enlace hidrógeno entre el H del NH de la posición 20 y el oxígeno del carboxilato.



**Figura 118.** Productos naturales con anillos 1,4,5,6-tetrahidropirimidina en su estructura.

Biogenéticamente, el anillo de tetrahidropirimidina y el fragmento formamido en **1** pueden haberse generado a partir de dos unidades de ácido fórmico y un ácido 3,5,6-triamino- $\omega$ -fenilnon-8-enoico, el cual podría originarse de una transaminación de un derivado del ácido  $\omega$ -fenilalquenoide. La formación biogenética del anillo de tetrahidropirimidina mediante la condensación de un compuesto diamino y ácido fórmico, se propuso primero en las manzacidins A-C. Por otro lado, los ácidos  $\omega$ -fenilalcanoides, ácidos grasos aromáticos con una unidad fenilo en el carbono terminal de la cadena, están muy presentes en la bibliografía.

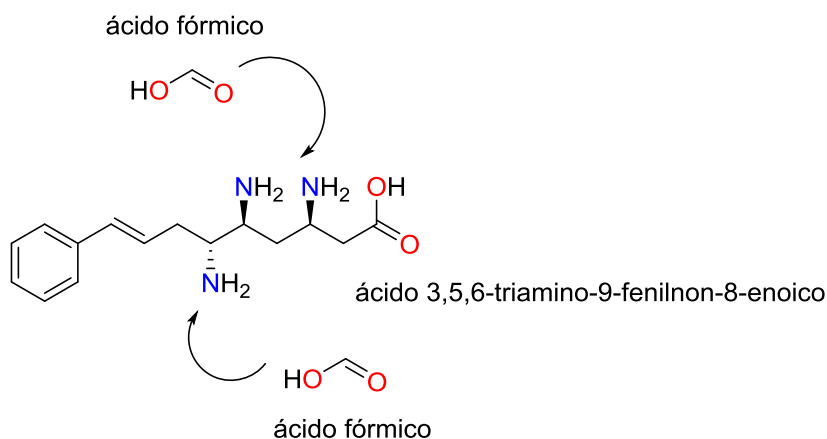
<sup>105</sup> Galinski, E. A.; Pfeiffer, H.-P.; Trüper, H. G. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 135-139.

<sup>106</sup> (a) Inbar, L.; Lapidot, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16014-16022; (b) Inbar, L.; Frolow, F.; Lapidot, A. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 897-906; (c) Castellanos, L.; Duque, C.; Zea, S.; Espada, A.; Rodríguez J.; Jiménez, C. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 4967-4970.

<sup>107</sup> Kobayashi, J.; Kanda, F.; Ishibashi, M.; Shigemori, H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4574-4576.



Por ejemplo, se han aislado de semillas lípidos de varios géneros de la subfamilia Araceae de Aracea,<sup>108</sup> de la grasa de la mantequilla,<sup>109</sup> así como de bacterias asociadas con el alga marina *Cladophora coelothrix*.<sup>110</sup> El origen biogenético de los ácidos grasos aromáticos se ha estudiado en multitud de ocasiones.<sup>111</sup>



**Figura 119.** Propuesta biogenética para el compuesto 6.

Los ensayos biológicos del compuesto **6** mostraron que posee una baja actividad citotóxica, obteniéndose (Tabla 15) unos valores de  $GI_{50} > 32 \mu M$  para pulmón (A-549), Colon (HT-29) y mama (MDA-MB-231), y de  $25 \mu M$  para páncreas (PSN-1).

**Tabla 15.** Actividad citotóxica del compuesto 6.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$
HT-29	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$
MDA-MB-231	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$
PSN-1	$25 \mu M$	$>32 \mu M$	$>32 \mu M$

<sup>108</sup> Meija, J.; Soukup, V. G. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2229–2237.

<sup>109</sup> Schröder, M.; Abdurahman, H.; Ruoff, T.; Lehnert, K.; Vetter, W. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, 91, 1695–1702.

<sup>110</sup> Carballeira, N. M.; Sostre, A.; Stefanov, K.; Popov, S.; Kujumigiev, A.; Dimitrova-Konaklieva, S.; Tosteson, C.G.; Tosteson, T. R. *Lipids* **1997**, 32, 1271–1275.

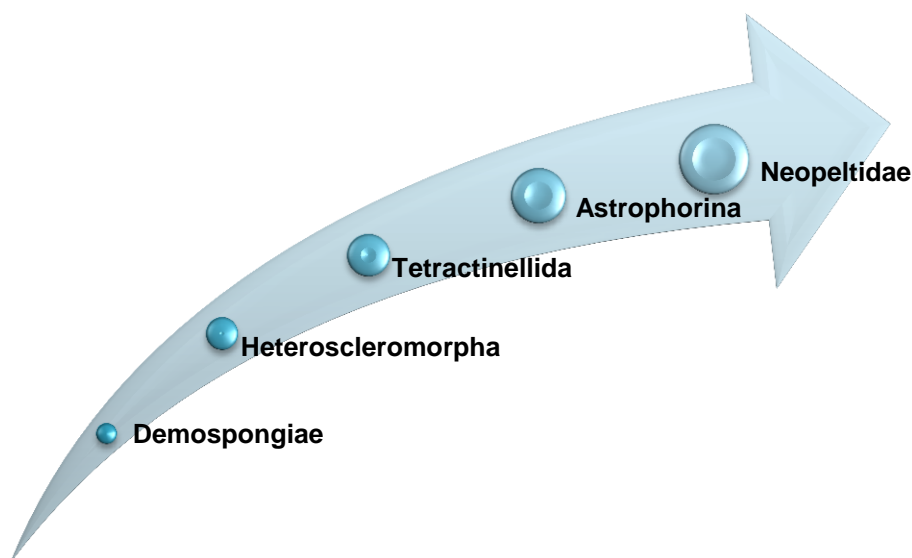
<sup>111</sup> Patton, S.; Kesler, E. M. *J. Dairy Sci.* **1967**, 50, 1505–1508. 5835



*CAPÍTULO V*  
*NEOPELTIDAE*

## 5. ESTUDIO DE LA ESPONJA NEOPELTIDAE

Las esponjas de la familia Neopeltidae pertenecen al suborden Astrophorina, orden Tetractinellida, subclase Heteroscleromorpha y clase Demospongiae (Esquema 9). Por motivos de confidencialidad, no se especificará ni el género ni la especie de la esponja que se estudia en este capítulo. Posee una estructura redondeada irregular con pequeñas aberturas sobre la superficie. Suele tener color amarillento grisáceo y un esqueleto más frágil que las del orden Tetractinellida. Estas esponjas de la familia Neopeltidae se encuentran en aguas muy profundas incluyendo arrecifes de coral.<sup>112</sup>



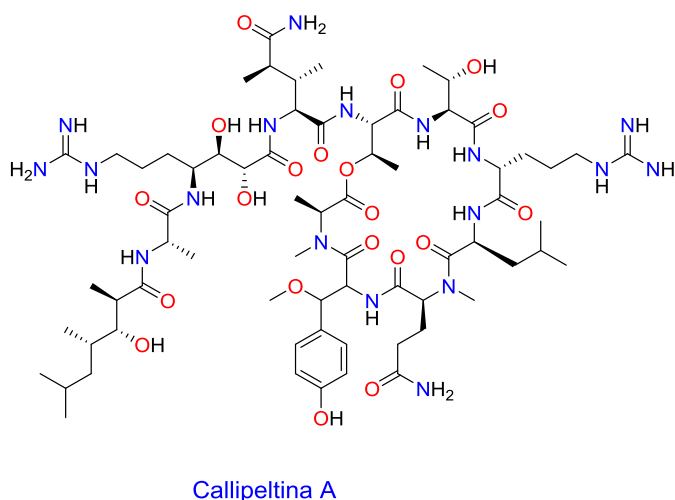
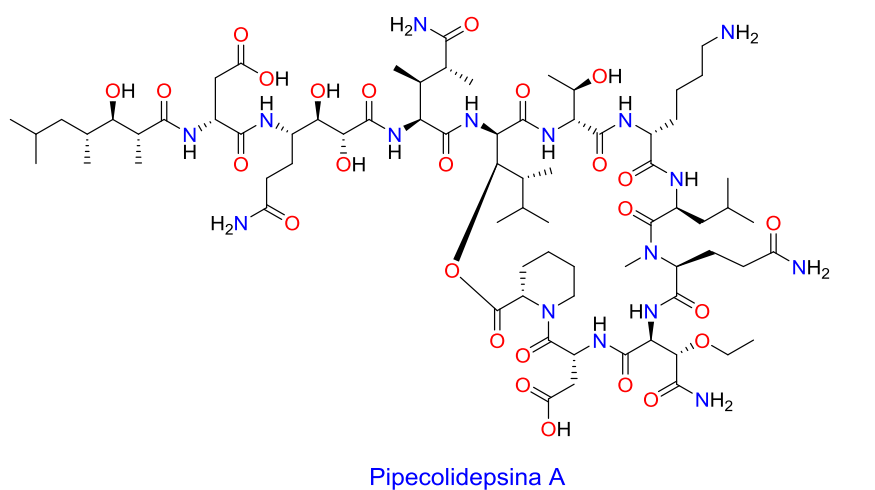
**Esquema 9.** Clasificación de las esponjas de la familia Neopeltidae.

---

<sup>112</sup> *Systema Porifera*; Hooper, J. N. A.; Van Soest, R. W. M.; Willenz, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002.

### 5.1. Compuestos aislados con anterioridad

De las esponjas de la familia Neopeltidae apenas se han aislado una decena de compuestos, lo que para una familia entera de esponjas es un número muy pequeño. Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran dos familias de péptidos (Figura 120) de alto peso molecular como son los pipecolidepsina y callipeltina. La pipecolidepsina A, cuyo aislamiento por Coello y *col.* se publicó en 2014, mostró actividad citotóxica relevante,<sup>113</sup> mientras que callipeltina A exhibió actividad protectora en células infectadas con VIH.<sup>114</sup>

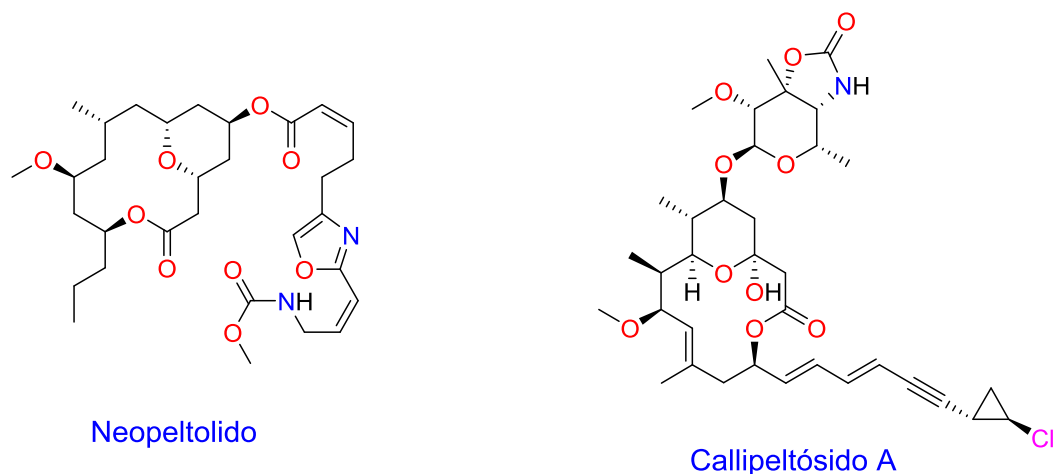


**Figura 120.** Péptidos aislados de esponjas pertenecientes a la familia Neopeltidae.

<sup>113</sup> Coello, L.; Reyes, F.; Martín, M. J.; Cuevas, C.; Fernández, R. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 298–303.

<sup>114</sup> Zampella, A.; D'Auria, M. V.; Paloma, L. G.; Casapullo, A.; Minale, L.; Debitus, C.; Henin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6202–6209.

Además de compuestos de naturaleza peptídica, se encontraron dos macrociclos (Figura 121): neopeltolido,<sup>115</sup> potente inhibidor del crecimiento de células tumorales, y callipeltósido A<sup>116</sup> que mostró actividad citotóxica moderada en carcinoma broncopulmonar de células no pequeñas.



**Figura 121.** Macrociclos aislados de esponjas pertenecientes a la familia Neopeltidae.

- <sup>115</sup> Wright, A. E.; Botelho, J. C.; Guzmán, E.; Harmody, D.; Linley, P.; McCarthy, P. J.; Pitts, T. P.; Pomponi, S. A.; Reed, J. K. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 412–416.
- <sup>116</sup> Zampella, A.; D'Auria, M. V.; Minale, L.; Debitus, C.; Roussakis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11085–11088.

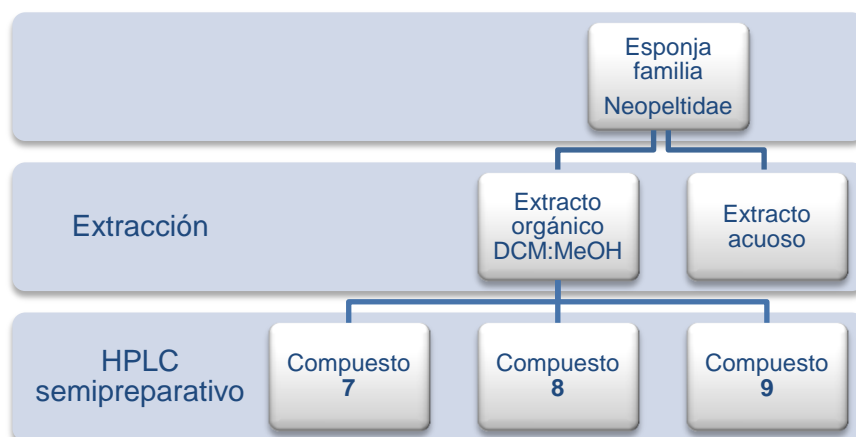
## 5.2. Neopeltidae

### 5.2.1 Identificación y clasificación

Durante el transcurso de una expedición en Indonesia realizada en 2014, el equipo de expediciones de PharmaMar recolectó una esponja de la familia Neopeltidae, de la que no se pueden ofrecer más detalles por motivos de confidencialidad.

### 5.2.2. Extracción y fraccionamiento

La esponja, una vez troceada, se sometió a una extracción con una mezcla de metanol:diclorometano (1:1) y posteriormente con agua. La fracción orgánica se purificó mediante HPLC semipreparativo, obteniéndose tres compuestos puros (**7-9**): 2.9 mg de **7**, 0.4 mg de **8** y 0.7 mg de **9**. El resumen del proceso de purificación viene recogido en el Esquema 10:



**Esquema 10.** Extracción y fraccionamiento de la esponja perteneciente a la familia Neopeltidae objeto de estudio en este trabajo.

Durante las etapas de fraccionamiento se estudió la actividad citotóxica de los extractos en un panel de cuatro líneas celulares tumorales: A-549 (pulmón), HT-29 (colon), MDA-MB-231 (mama) y PSN-1 (colon). Los compuestos aislados se estudiaron mediante espectrometría de masas y RMN con el fin de determinar su estructura química, tal como se describe a continuación.

### 5.2.3. Determinación estructural

#### 5.2.3.1. Enigmazol C (7)

La fórmula molecular de  $C_{29}H_{41}NO_7$  para el compuesto **7** se determinó a partir de su espectro de masas de alta resolución (+)-HRESITOF al mostrar los iones  $[M+H]^+$  a  $m/z$  516.3033 (calc. para  $C_{29}H_{42}NO_7$   $m/z$  516.2956  $\Delta m = 0.0077$  uma) y  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  538.2862 (calc.  $C_{29}H_{42}NO_7Na$   $m/z$  538.2775  $\Delta m = 0.0087$  uma).

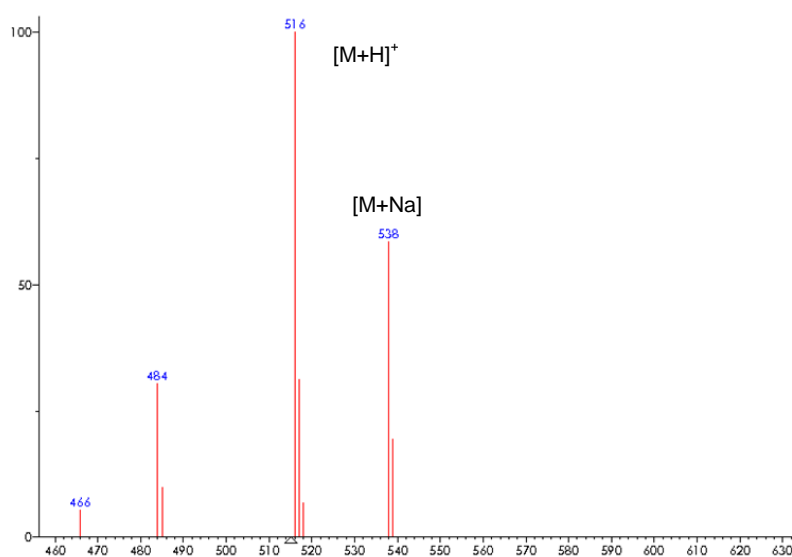


Figura 122. Espectro de masas de baja resolución (+)-ESI-TOF del compuesto **7**.

Una vez determinada la fórmula molecular del compuesto **7**, se realizaron experimentos mono y bidimensionales de RMN para determinar su estructura, usando  $CD_3CN$  como disolvente deuterado, ya que se observó descomposición cuando se empleaba  $CD_3OD$ .



Del estudio de su espectro de HSQC-editado (ver Figura 125), en combinación con sus espectros monodimensionales de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 123) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 124), se dedujo que **7** contenía siete carbonos no protonados  $sp^2$  ( $\delta_{\text{C}}$  193.6, 175.6, 175.6, 161.2, 152.7, 143.9 y 141.7), correspondiendo el primero de ellos a un grupo carbonilo de cetona conjugada. Además se observaron tres metinos  $sp^2$  ( $\delta_{\text{H}}$  7.63 /  $\delta_{\text{C}}$  135.9, 6.20/113.6 y 5.30/106.8), un metileno  $sp^2$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.91;4.86 /  $\delta_{\text{C}}$  113.9), seis metinos  $sp^3$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.92 /  $\delta_{\text{C}}$  66.7, 5.20/75.5, 4.48/77.8, 3.74/69.5, 2.49/39.9 y 2.20/25.8), siete metilenos  $sp^3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.72;2.62 /  $\delta_{\text{C}}$  42.2, 2.49;2.27/44.6, 2.49;1.59/40.2, 2.41;2.23/42.2, 1.81;1.46/42.9, 1.69;1.63/30.8 y 1.43;1.31/34.5) y cinco metilos ( $\delta_{\text{H}}$  3.15 /  $\delta_{\text{C}}$  56.6, 1.86/17.7, 1.23/19.5, 1.10/17.5 y 0.95/21.2). También se observó un protón intercambiable con deuterio a  $\delta_{\text{H}}$  2.98 perteneciente a un grupo OH. Todos estos desplazamientos químicos se recogen en la Tabla 14.

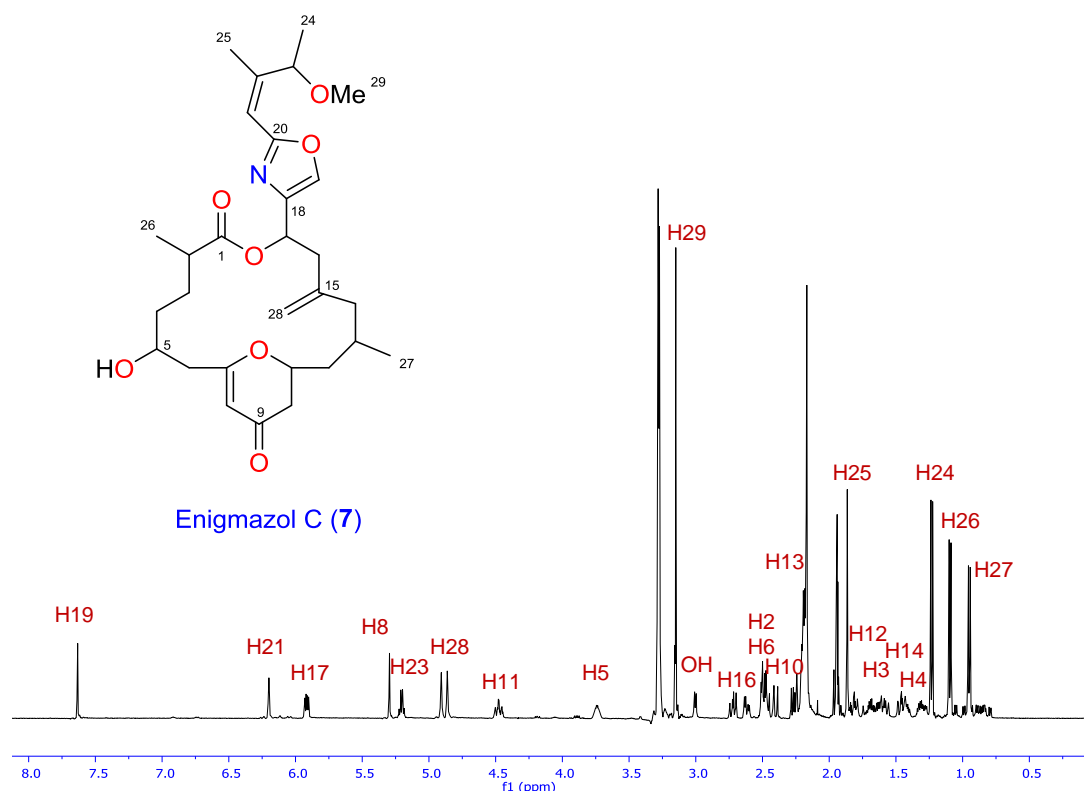


Figura 123. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **7**.

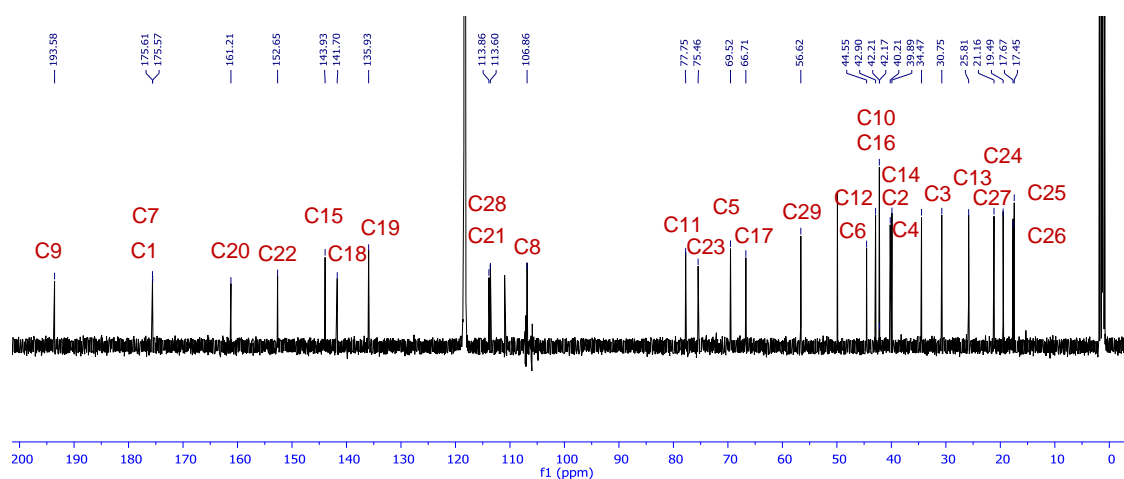


Figura 124. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto 7.

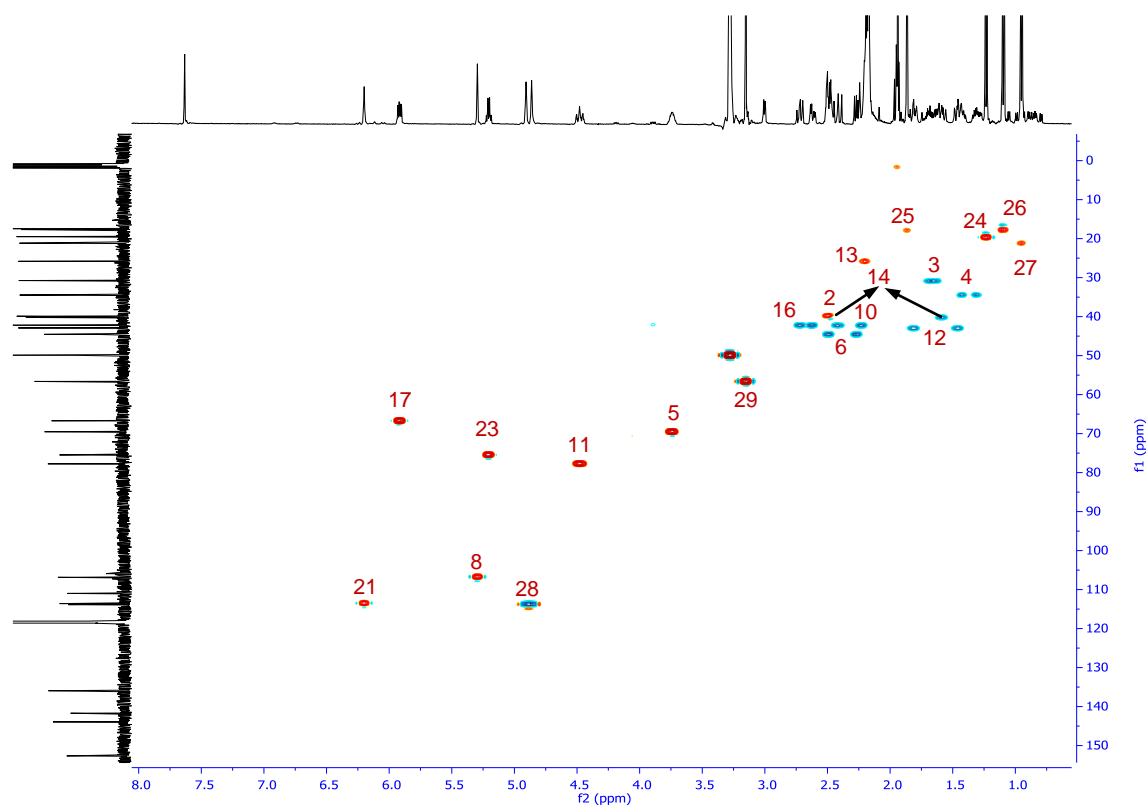
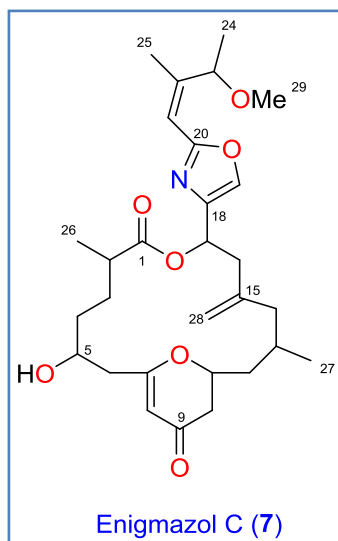


Figura 125. Espectro HSQC-editado ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto 7.

Tabla 16. Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de enigmazol C (**7**) ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ).

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , mult (J in Hz)
1	175.6, C	
2	39.9, CH	2.49, m
3	30.8, $\text{CH}_2$	1.69, m 1.63, m
4	34.5, $\text{CH}_2$	1.43, m 1.31, m
5	69.5, CH	3.74, dddd (10.4, 7.6, 5.5, 5.5, 2.5)
6	44.6, $\text{CH}_2$	2.49, dd (13.1, 5.1) 2.27, dd (13.3, 7.7)
7	175.6, C	
8	106.8, CH	5.30, d (1.0)
9	193.6, C	
10	42.2, $\text{CH}_2$	2.41, dd (16.7, 14.1) 2.23, dd (16.8, 2.4)
11	77.8, CH	4.48, dddd (14.0, 10.9, 2.7, 2.7)
12	42.9, $\text{CH}_2$	1.81, ddd (14.0, 10.9, 2.7) 1.46, dd (14.3, 11.1)
13	25.8, CH	2.20, m
14	40.2, $\text{CH}_2$	2.49, dd (16.0, 1.5) 1.59, dd (15.6, 10.7)
15	143.9, C	
16	42.2, $\text{CH}_2$	2.72, dd (13.7, 9.6) 2.62, dd (13.7, 5.2)
17	66.7, CH	5.92, ddd (9.4, 5.2, 0.8)
18	141.7, C	
19	135.9, CH	7.63, d (0.7)
20	161.2, C	
21	113.6, CH	6.20, dd (1.5, 0.8)
22	152.7, C	
23	75.5, CH	5.20, dd (6.5, 0.8)
24	19.5, $\text{CH}_3$	1.23, d (6.5)
25	17.7, $\text{CH}_3$	1.86, d (1.5)
26	17.5, $\text{CH}_3$	1.10, d (6.9)
27	21.2, $\text{CH}_3$	0.95, d (6.7)
28	113.9, $\text{CH}_2$	4.91, s 4.86, s
29	56.6, $\text{CH}_3$	3.15, s
OH		2.98, d (5.5)

Los diferentes sistemas de espín del compuesto **7** se dedujeron del estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, así como de los experimentos selectivos 1D-TOCSY.

El análisis del experimento COSY del compuesto **7** permitió deducir los sistemas de espín correspondientes a los fragmentos **A-C** en su estructura. Así, el fragmento **A**, obtenido mediante correlaciones COSY, fue el formado por el metilo H24 ( $\delta_{\text{H}}$  1.23) y el metino H23 ( $\delta_{\text{H}}$  5.20), que tal como su desplazamiento químico a 75.5 ppm sugiere, está unido a un átomo de oxígeno. El siguiente fragmento **B** deducido fue el formado por el metino H17 ( $\delta_{\text{H}}$  5.92) y el metileno H16 ( $\delta_{\text{H}}$  2.72;2.62), cuyos desplazamientos de carbono indican que C17 ( $\delta_{\text{C}}$  66.7) está unido a un átomo de oxígeno mientras que los de C16 ( $\delta_{\text{C}}$  42.2) sugieren que podría estar unido a un doble enlace. La débil correlación observada en el COSY entre H17 ( $\delta_{\text{H}}$  5.92) y H19 ( $\delta_{\text{H}}$  7.63), confirmada por la pequeña  $J$  observada entre ellos de 0.8 Hz, indicó que ambos estaban acoplados con una constante de acoplamiento alílico a través de un doble enlace. El metilo H25 ( $\delta_{\text{H}}$  1.86), que fue situado sobre doble enlace en C21-C22, mostró también un acoplamiento alílico con H21 ( $\delta_{\text{H}}$  6.20), deduciéndose la presencia de un doble enlace trisustituido en el fragmento que hemos denominado **C**. Las señales observadas en el experimento COSY del compuesto **7**, que fueron claves en la determinación de mencionados sistemas de espín, se muestran en la Figura 126.

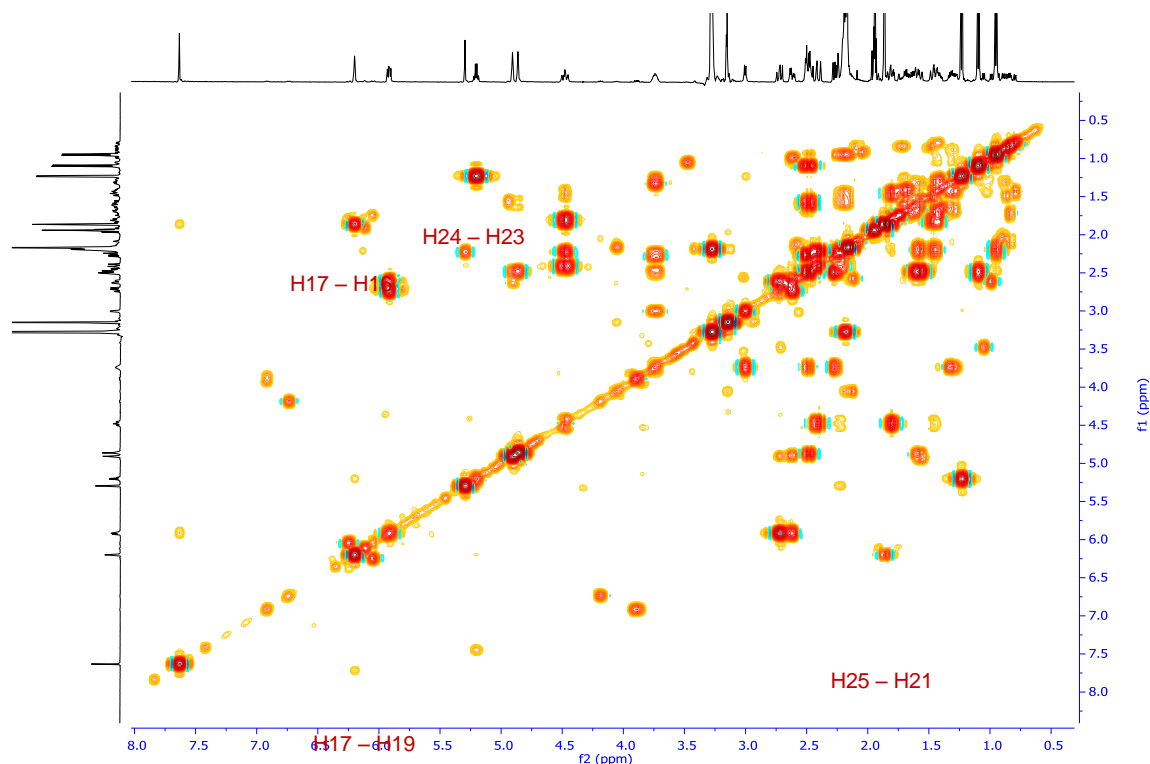
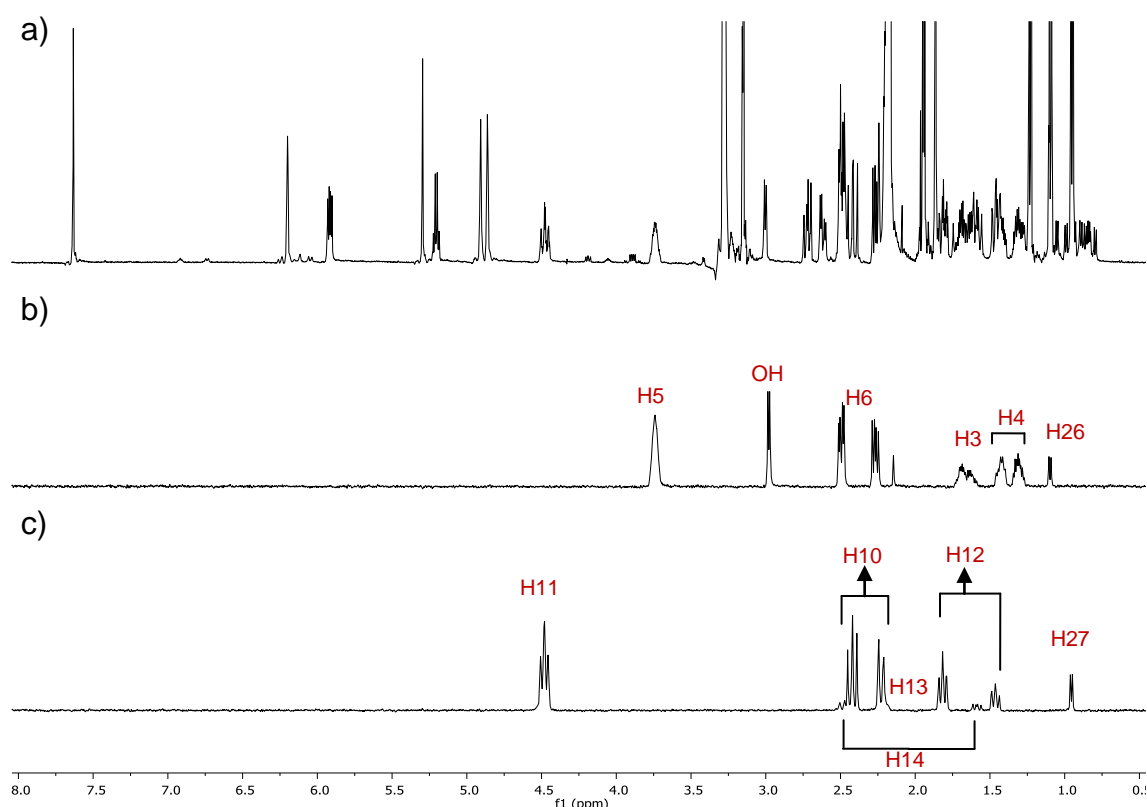


Figura 126. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **7**.

La determinación de los otros dos sistemas de espín en **7**, correspondientes a los fragmentos **D** y **E**, se llevó a cabo mediante el uso de experimentos monodimensionales 1D-TOCSY, que se completaron a través de las correlaciones observadas en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Así, la irradiación selectiva 1D-TOCSY de la señal a  $\delta_{\text{H}}$  3.74 (**H5**) permitió detectar todos los protones correspondientes al sistema de espín **D**, tal como se muestra en la Figura 127b. Junto a la señal perteneciente a **H5** ( $\delta_{\text{H}}$  3.74), se observaron los tres metilenos correspondientes a **H3** ( $\delta_{\text{H}}$  1.69; 1.63), **H4** ( $\delta_{\text{H}}$  1.43; 1.31) y **H6** ( $\delta_{\text{H}}$  2.49; 2.27), el metino **H2** ( $\delta_{\text{H}}$  2.49), el metilo **H26** ( $\delta_{\text{H}}$  1.10) y el protón del hidroxilo a  $\delta_{\text{H}}$  2.98. Las correlaciones observadas en el experimento COSY entre **H2** y las protones **H3** y **H26**, las correspondientes a **H5** con **H4**, **H6** y el **OH**, y la unión de ambos fragmentos por la señal observada entre **H3** y **H4**, completó la asignación final de este fragmento **D**. Los desplazamientos químicos de los carbonos **C2** ( $\delta_{\text{C}}$  39.9) y **C6** ( $\delta_{\text{C}}$  44.6) indicaron que estos están unidos a carbonos  $sp^2$ .



**Figura 127.** a) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **7** en  $\text{CD}_3\text{CN}$ . b) 1D-TOCSY sobre la señal de  $\text{H5}$  ( $\delta_{\text{H}} 3.74$ ). c) 1D-TOCSY sobre la señal de  $\text{H11}$  ( $\delta_{\text{H}} 4.48$ ).

La determinación del fragmento **E** se llevó a cabo mediante un experimento de irradiación selectiva 1D-TOCSY de la señal de  $\text{H11}$  ( $\delta_{\text{H}} 4.48$ ), tal como que se muestra en la Figura 127c. Junto a la señal  $\text{H11}$  ( $\delta_{\text{H}} 4.48$ ), se identificaron los tres metilenos  $\text{H10}$  ( $\delta_{\text{H}} 2.41$ ;  $2.23$ ),  $\text{H12}$  ( $\delta_{\text{H}} 1.81$ ;  $1.46$ ) y  $\text{H14}$  ( $\delta_{\text{H}} 2.49$ ;  $1.59$ ), el metino  $\text{H13}$  ( $\delta_{\text{H}} 2.20$ ) y el metilo  $\text{H27}$  ( $\delta_{\text{H}} 0.95$ ). Las correlaciones observadas en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY entre  $\text{H11}$  y las señales de  $\text{H10}$  y  $\text{H12}$ , junto con las correspondientes a  $\text{H13}$  con  $\text{H12}$ ,  $\text{H14}$  y  $\text{H27}$ , determinaron la secuencia final de este sistema de espín. Los desplazamientos de los carbonos  $\text{C10}$  ( $\delta_{\text{C}} 42.2$ ) y  $\text{C14}$  ( $\delta_{\text{C}} 40.2$ ) indicaron que están unidos a un carbono  $\text{sp}^2$  mientras que el desplazamiento químico de  $\text{C11}$  ( $\delta_{\text{C}} 77.8$ ) indica que está unido a un átomo de oxígeno.

Una vez determinados los cinco sistemas de espines del compuesto **7** que se muestran en la Figura 128, el siguiente paso fue realizar la conexión entre ellos.

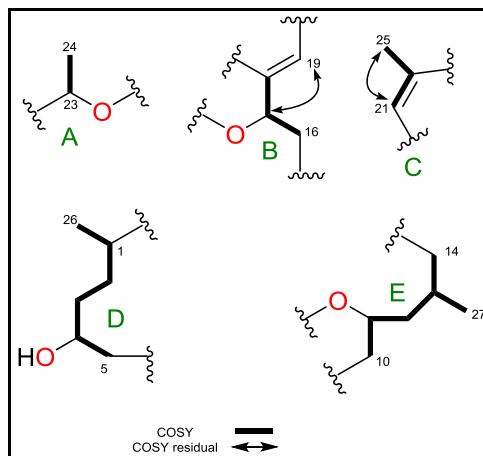


Figura 128. Sistemas de espines del compuesto **7**.

Para conectar entre sí los cinco sistemas de espines y el resto de las señales, se recurrió al experimento bidimensional HMBC (Figura 132). El metino **H23** ( $\delta_H$  5.20) mostró correlación con los metilos C24 ( $\delta_C$  19.5), C25 ( $\delta_C$  17.7), el metoxilo C29 ( $\delta_C$  56.6) y con el metino C21 ( $\delta_C$  113.6). Estas correlaciones localizaron al grupo metoxilo sobre C23 y permitieron conectar los fragmentos **A** y **B**. La correlación observada entre **H21** ( $\delta_H$  6.20) y C22 ( $\delta_C$  152.7) permitió asignar el carbono cuaternario completando doble enlace.

El experimento de RMN HSQC-editado realizado con una constante de acoplamiento estándar ( $^1J_{CH} = 140$  Hz) no permitió correlacionar directamente la señal del grupo metino  $sp^2$  a  $\delta_H$  7.63 con su carbono a 135.9 ppm, debido a que la constante de acoplamiento entre ellos es de 209.7 Hz. Aún así, sí observamos los satélites HSQC residuales en el experimento HMBC, lo que determinó la unión entre ambos.

Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de este metino  $sp^2$  a  $\delta_{\text{H}}$  7.63/ $\delta_{\text{C}}$  135.9, junto con el valor de la  $^1J_{\text{CH}}$ , sugieren la presencia de un anillo de oxazol, que se completó con los carbonos C18 ( $\delta_{\text{C}}$  141.7) y C20 ( $\delta_{\text{C}}$  161.2) por las correlaciones observadas en el experimento HMBC. La correlación observada entre H25 ( $\delta_{\text{H}}$  1.86) y C20 ( $\delta_{\text{C}}$  161.2), determinó la unión entre los fragmentos **B** y **C** tal como se muestra en la Figura 129.

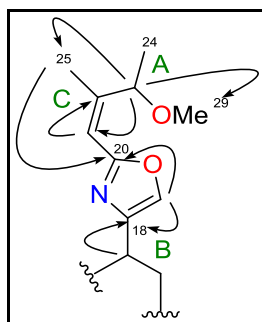


Figura 129. Correlaciones HMBC observadas entre el fragmento **A**, **B** y **C**.

Los fragmentos **C** y **E** se unieron a través del doble enlace  $\Delta^{15(28)}$  a partir de las correlaciones a larga distancia de los protones de H28 ( $\delta_{\text{H}}$  4.91;4.86) con los carbonos C14 ( $\delta_{\text{C}}$  40.2) y C16 ( $\delta_{\text{C}}$  42.2). Del mismo modo, la conexión de los sistemas **D** y **E** a través del metino  $sp^2$  a  $\delta_{\text{H}}$  5.30 /  $\delta_{\text{C}}$  106.8, se dedujo a partir de la correlación del protón H8 ( $\delta_{\text{H}}$  5.30) con los carbonos C6 ( $\delta_{\text{C}}$  44.6) y C10 ( $\delta_{\text{C}}$  42.2). Las correlaciones observadas entre H10 ( $\delta_{\text{H}}$  2.41;2.23) con C9 ( $\delta_{\text{C}}$  193.6) y H8 ( $\delta_{\text{H}}$  5.30) con C7 ( $\delta_{\text{C}}$  175.6) permitieron completar un anillo de dihidropiranona tal como muestra la Figura 130.

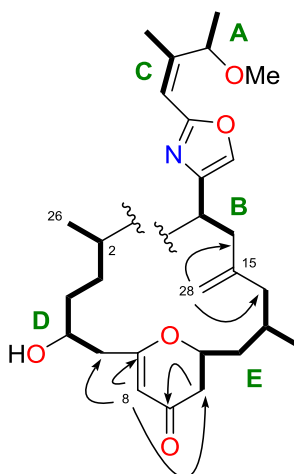


Figura 130. Correlaciones clave HMBC que permiten conectar los fragmentos **C**, **D** y **E** del compuesto 7.



Por último, las correlaciones HMBC entre los protones H26 ( $\delta_H$  1.10) y H17 ( $\delta_H$  5.92) con el carbono C1 ( $\delta_C$  175.6) permitió conectar los fragmentos **D** y **B** a través de un enlace éster de lactona y completar la estructura plana macrocíclica del compuesto **7** tal como se muestra en Figura 131.

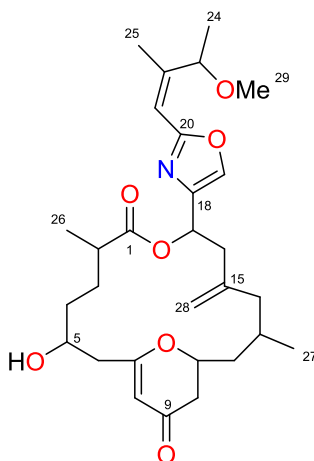


Figura 131. Estructura plana del compuesto **7**.

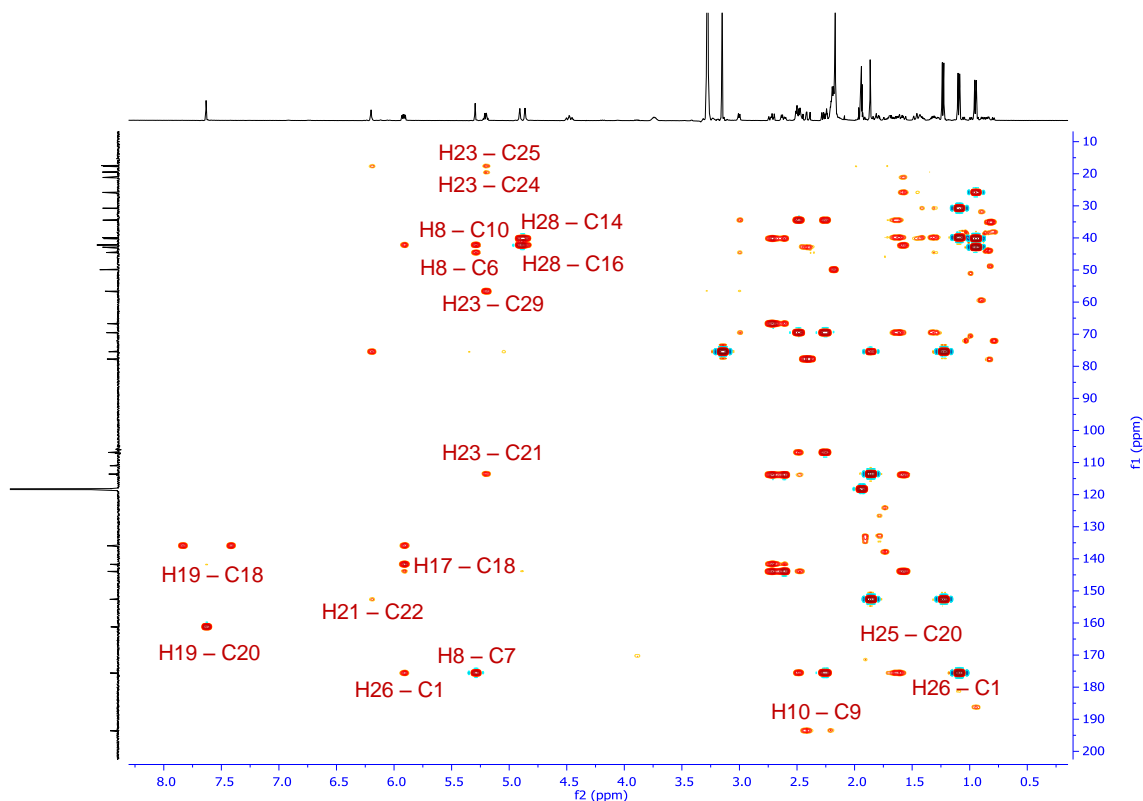
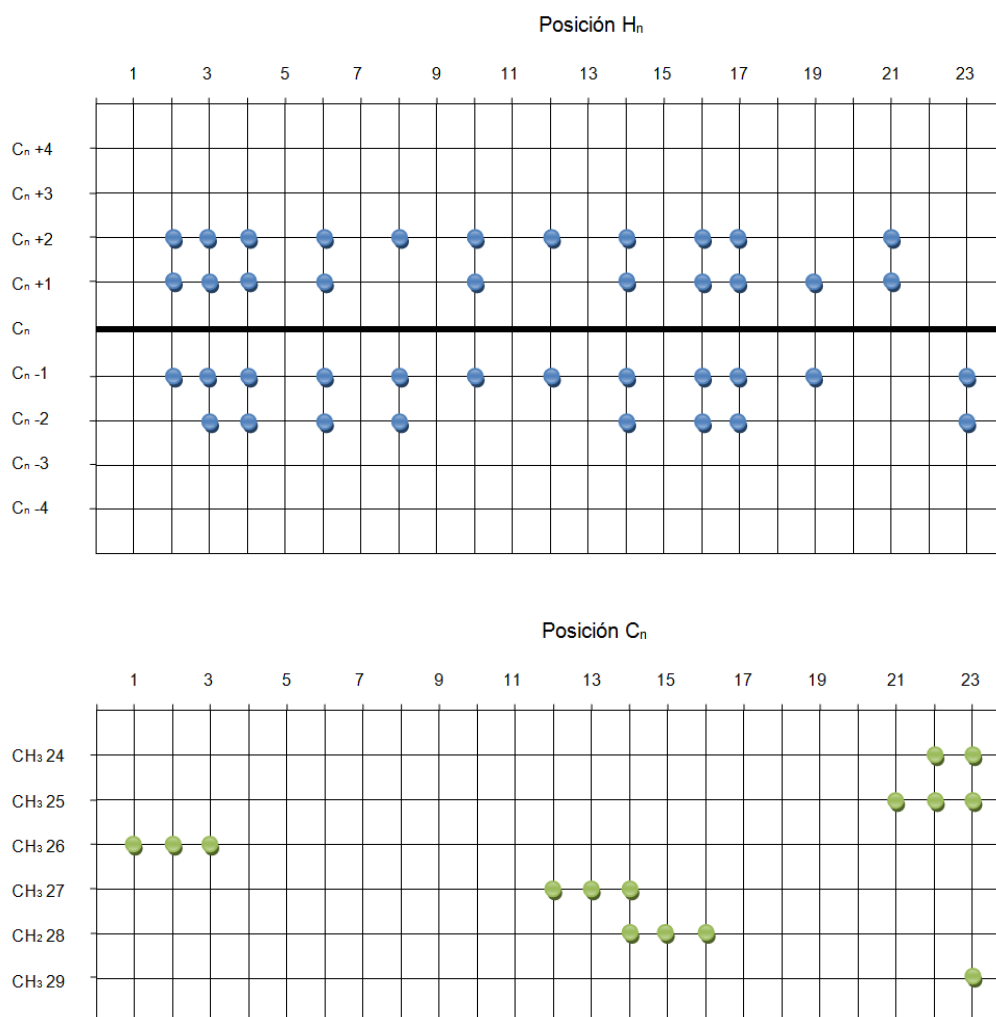


Figura 132. Experimento HMBC ( $CD_3CN$ ) del compuesto **7**.

Todas las correlaciones observadas en el experimento bidimensional HMBC, se recogen en la Figura 133:



**Figura 133.** Correlaciones HMBC del compuesto **7**.

Dada la gran similitud estructural del compuesto **7** con la de los de la familia descrita como enigmazoles,<sup>117</sup> se optó por nombrar a este nuevo compuesto como enigmazol C.

<sup>117</sup> Oku, N.; Takada, K.; Fuller, R. W.; Wilson, J. A.; Peach, M. L.; Pannell, L. K.; McMahon, J. B.; Gustafson, K. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10278–10285.

### 5.2.3.2. Producto de degradación de enigmazol C (7) durante la purificación, compuesto 8.

Durante el proceso de purificación del compuesto **7** mediante HPLC, usando como fase móvil MeOH/H<sub>2</sub>O, se observó la aparición de un pico cromatográfico adicional, compuesto **8**, con un tiempo de retención mayor que sugirió que el compuesto sufría algún tipo de transformación. Su espectro de masas de alta resolución de HRESITOF mostró el ión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  548.3249 que se corresponde a la fórmula molecular de C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>8</sub> (calc. para C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>8</sub>  $m/z$  548.3218  $\Delta m = 0.0031$  uma).

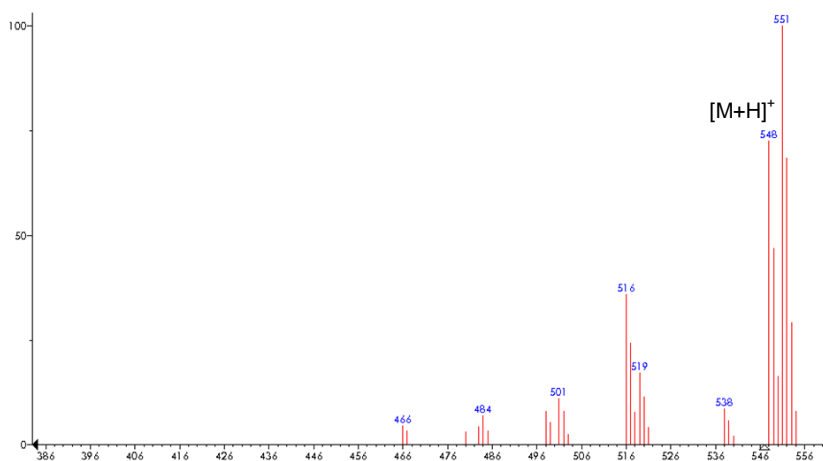
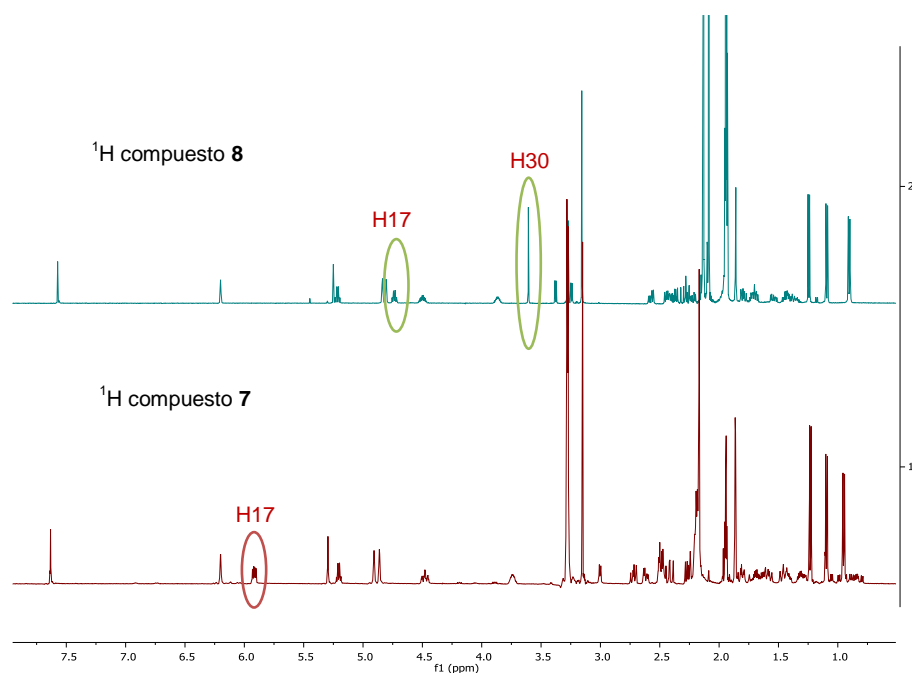


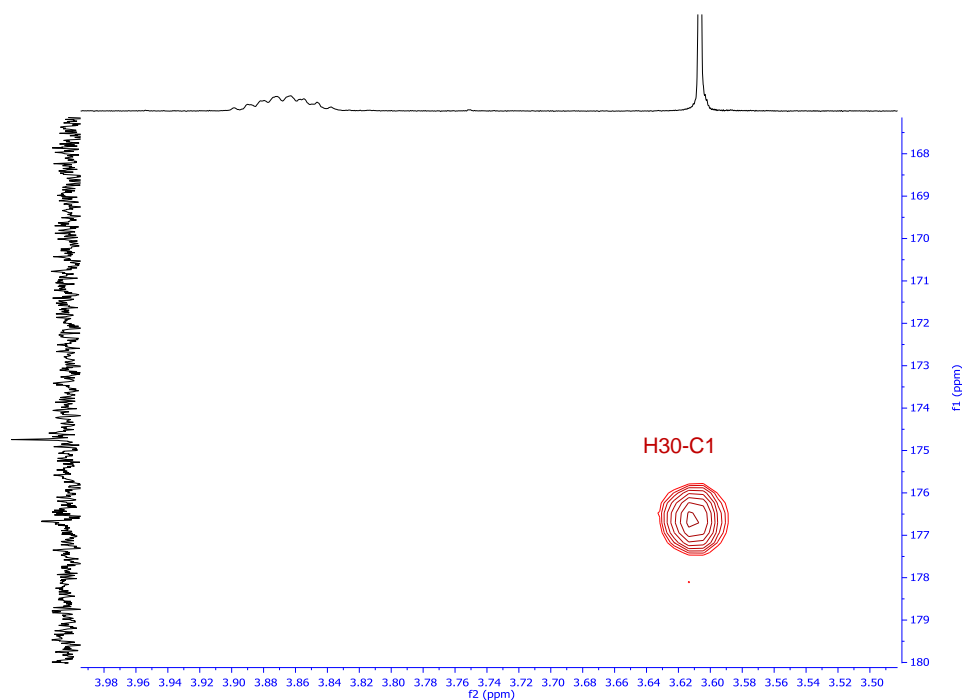
Figura 134. Espectro de masas de baja resolución ESITOF del compuesto 8.

La escasa cantidad obtenida del compuesto **8** no permitió realizar un estudio profundo por RMN mediante experimentos bidimensionales. Por ello, se comparó el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **8** con el del **7** para deducir su estructura (ver Figura 135). Dicha comparación mostró que ambos compuestos eran muy similares, diferenciándose únicamente en el desplazamiento químico correspondiente a H17 (4.74 ppm en **8** frente a 5.92 ppm en **7**) y en la aparición de una nueva señal en el espectro de RMN de H<sup>1</sup> del compuesto **8** a 3.61 ppm que se asignó a la presencia de un grupo metoxilo adicional (H30).



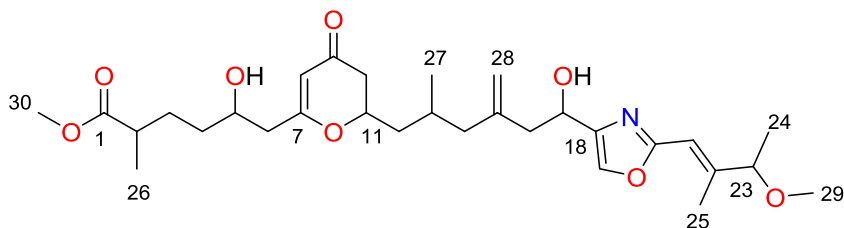
**Figura 135.** Comparación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **8** (arriba) y **7** (abajo).

La localización del grupo metoxilo adicional como éster metílico en el compuesto **8** se estableció mediante el experimento HMBC a partir de la correlación entre la señal del grupo metilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.61 con el carbono C1 a  $\delta_{\text{C}}$  176.6 (Figura 136).



**Figura 136.** Ampliación del HMBC del compuesto **8**.

Del anterior análisis estructural del compuesto **8** se dedujo que su estructura se corresponde con la del producto de apertura de la lactona del compuesto **7** con la consiguiente formación de un éster metílico. Con el fin de determinar si además de su naturaleza de artefacto también se encontraba como producto natural, se realizó un análisis retrospectivo de los cromatogramas de los extractos iniciales, no detectándose la presencia del compuesto **8**. Este resultado confirmó que el compuesto **8** es un artefacto de **7**.

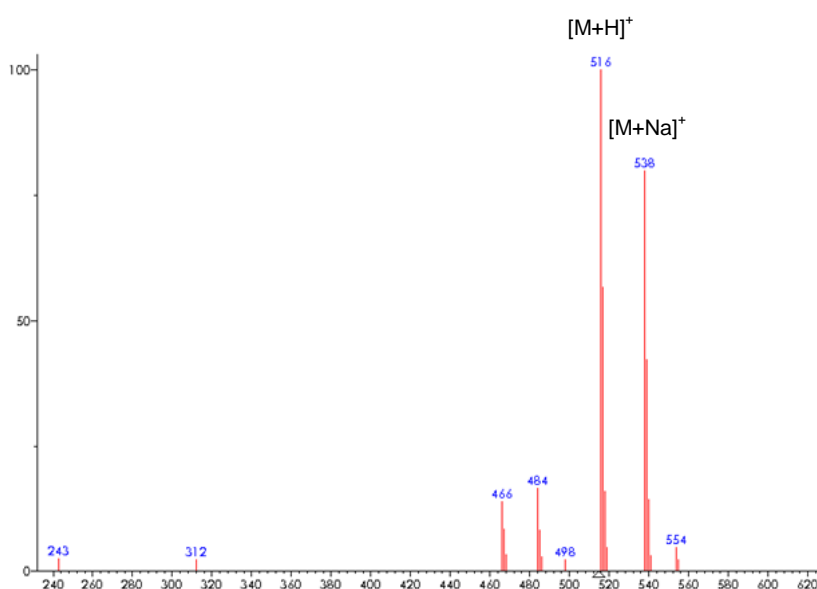


Producto degradación de enigmazol C

Figura 137. Estructura de compuesto **8**.

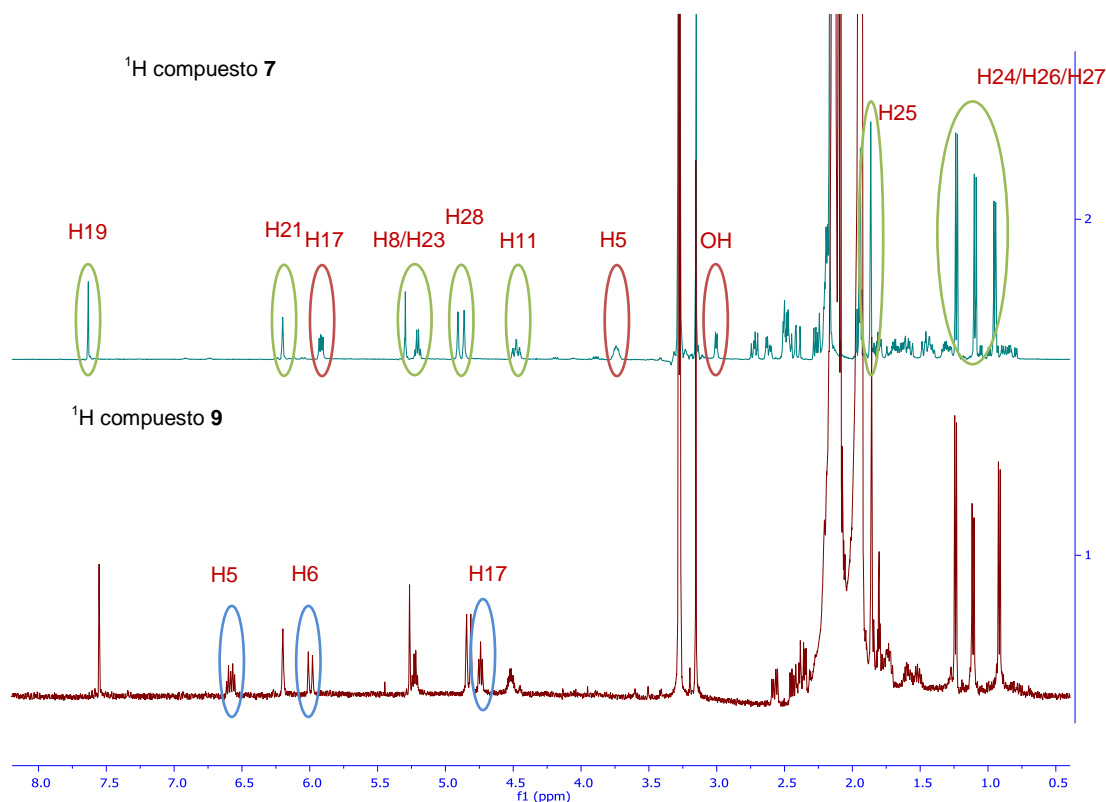
**5.2.3.3. Enigmazol D (9)**

El compuesto **9** (0.4 mg) se aisló como un sólido blanco. El espectro de masas de alta resolución HRESITOF del compuesto **9** mostró el ión  $[M+H]^+$  (Figura 138) a  $m/z$  516.2932 correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{29}H_{42}NO_7$  (calc. para  $C_{29}H_{42}NO_7$   $m/z$  516.2956  $\Delta m = 0.0024$  uma).



**Figura 138.** Espectro de masas de baja resolución ESITOF del compuesto **9**.

La poca cantidad de muestra disponible del compuesto **9** no permitió realizar un estudio completo mediante RMN, por lo que se realizó un análisis exhaustivo de su espectro de RMN de  $^1H$  y su comparación con el del compuesto **7** para su determinación estructural (ver Figura 139).



**Figura 139.** Comparación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **7** (arriba) y **9** (abajo).

Como se puede observar en la Figura 139, hay mucha similitud entre los dos compuestos. El compuesto **9** contiene 3 metilos dobletes **H24** ( $\delta_{\text{H}}$  1.24), **H26** ( $\delta_{\text{H}}$  1.11) y **H27** ( $\delta_{\text{H}}$  0.92) y un metilo doblete sobre doble enlace **H25** ( $\delta_{\text{H}}$  1.86) de forma similar al compuesto **7**. Al igual que enigmazol C (**7**), en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** también se observan señales correspondientes a cinco metinos **H19** ( $\delta_{\text{H}}$  7.55), **H21** ( $\delta_{\text{H}}$  6.20), **H8** ( $\delta_{\text{H}}$  5.26), **H23** ( $\delta_{\text{H}}$  5.22) y **H11** ( $\delta_{\text{H}}$  4.52), y de **H28** ( $\delta_{\text{H}}$  4.83) del doble enlace exocíclico.

Pero a diferencia de **7**, en **9** se observó la aparición de tres nuevas señales, correspondientes a **H5** ( $\delta_{\text{H}}$  6.58), **H6** ( $\delta_{\text{H}}$  6.00) y **H17** ( $\delta_{\text{H}}$  4.74), y la desaparición de **H17** ( $\delta_{\text{H}}$  5.92), **H5** ( $\delta_{\text{H}}$  3.74) y del **OH** ( $\delta_{\text{H}}$  2.98) presentes en **7**. En la Figura 139 se muestran en verde las señales similares en ambos compuestos, en rojo las que desaparecen en el compuesto **7** y en azul las que aparecen en el compuesto **9**.

Tras realizar el experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, se observa que las señales nuevas **H5** ( $\delta_{\text{H}}$  6.58) y **H6** ( $\delta_{\text{H}}$  6.00) se acoplan entre sí, y que **H5** también lo hace con **H4** ( $\delta_{\text{H}}$  2.21). Los desplazamientos químicos sugieren que se trata de un doble enlace, lo que junto a la pérdida de la señal correspondiente al hidroxilo del compuesto **7** y el metino sobre el que estaba, estas señales sugirieron la presencia de un doble enlace entre C5 y C6.

Por otro lado, la nueva señal a  $\delta_{\text{H}}$  4.74, que mostró correlación en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY con un metileno a  $\delta_{\text{H}}$  2.58-2.46, y la desaparición de la señal del grupo metino unido a oxígeno sobre el que se cerraba el ciclo **H17** ( $\delta_{\text{H}}$  5.92) de **7**, sugirió que el anillo de lactona podría haberse abierto lo que explicaría el cambio de desplazamiento químico de **H17** de  $\delta_{\text{H}}$  5.92 a  $\delta_{\text{H}}$  4.74. Las señales observadas en el experimento COSY se muestran en la Figura 140.

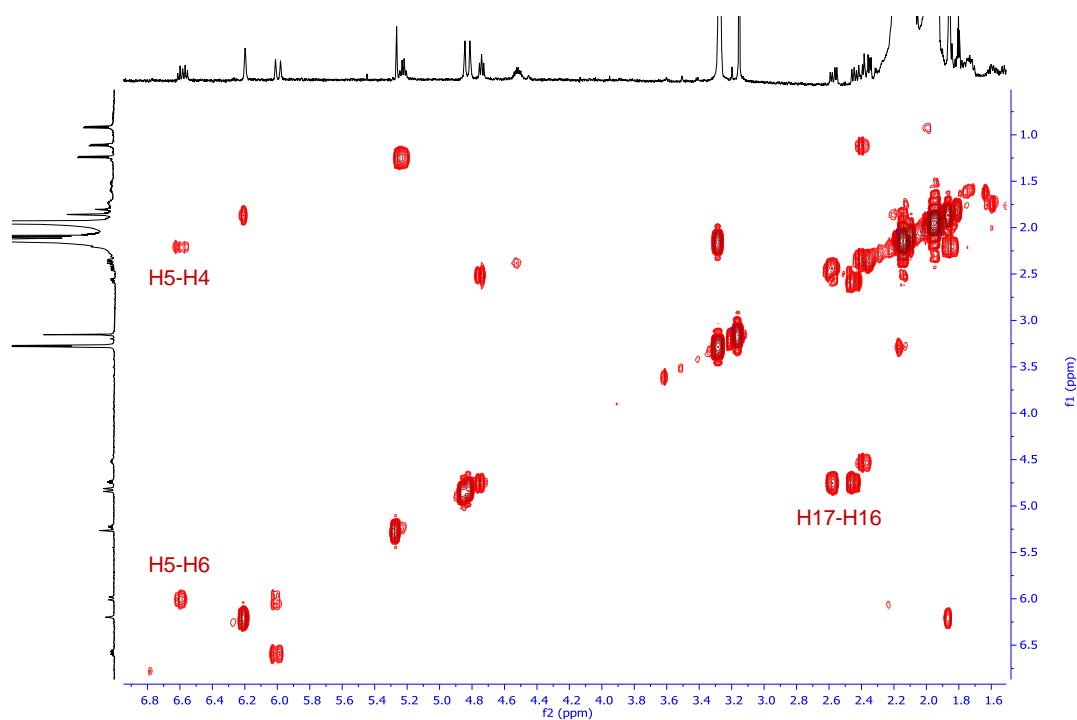


Figura 140. Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del compuesto **9**.



Con estos datos, se dedujo la estructura plana de este compuesto al que hemos denominado enigmazol D (9).

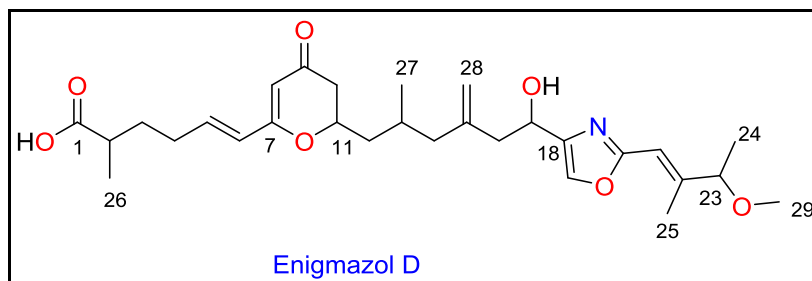


Figura 141. Estructura plana del compuesto 9.

#### 5.2.3.4. Determinación de la estereoquímica de Enigmazol C (7)

Una vez determinada la estructura plana, se procedió al estudio de la estereoquímica del compuesto 7.

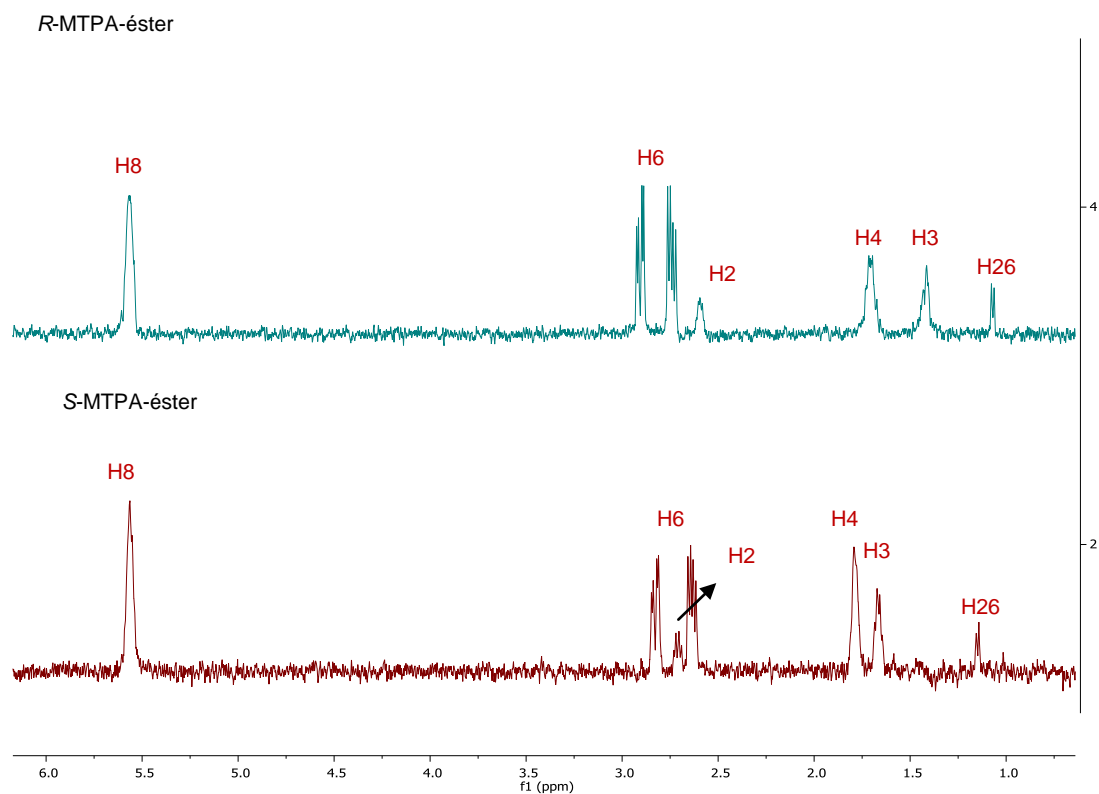
##### a) Estereoquímica absoluta de C5.

El primer paso fue la determinación de la configuración de C5, que se llevó a cabo mediante el método de Mosher,<sup>118</sup> tratado en profundidad en el Capítulo II, y con el que se obtendría además su configuración. La reacción de 7 con los reactivos quirales *R* y *S* del cloruro de ácido del MTPA permitió la obtención de los respectivos ésteres sobre el grupo hidroxilo de la posición C5.

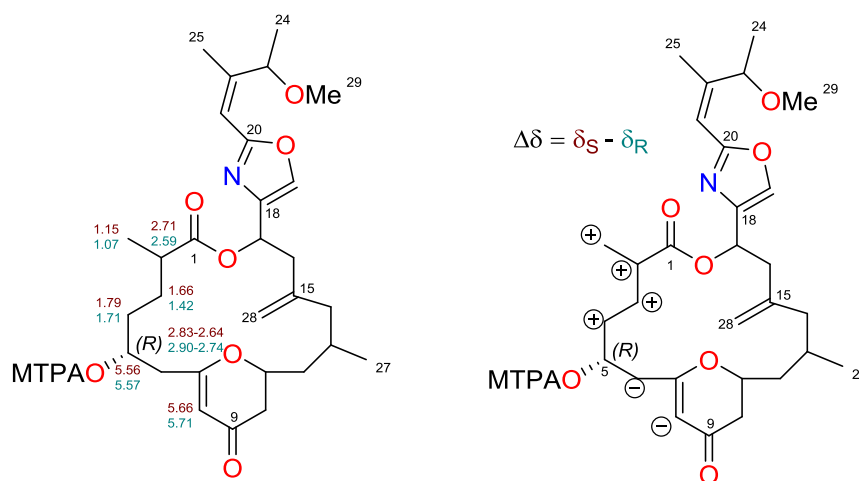
El análisis de los desplazamientos químicos de protón y el <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de los dos ésteres, permitió calcular los valores de las  $\Delta\delta_H = \delta_S - \delta_R$  de los protones entorno a C5. La distribución consistente de las  $\Delta\delta$  positiva y negativa alrededor de C5 permitió asignar la configuración 5*R*. En la Figura 142 se muestran las señales de los protones de ambos ésteres a partir de las cuales se pudieron determinar los valores de las diferencias de los desplazamientos químicos  $\Delta\delta$ . La irradiación selectiva 1D-TOCSY sobre el protón H8, fácilmente identificable en los espectros de RMN <sup>1</sup>H, permitió confirmar la asignación de los protones entorno a C5 en cada uno de los ésteres.

---

<sup>118</sup> Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.



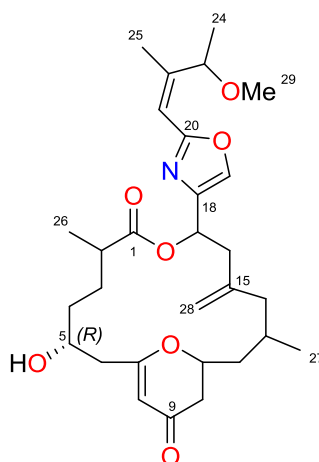
**Figura 142.** 1D-TOCSY selectivos de los ésteres MTPA formados a partir del compuesto **7** en piridina deuterada.



**Figura 143.** Determinación de la configuración absoluta de C5 en el compuesto **7**.

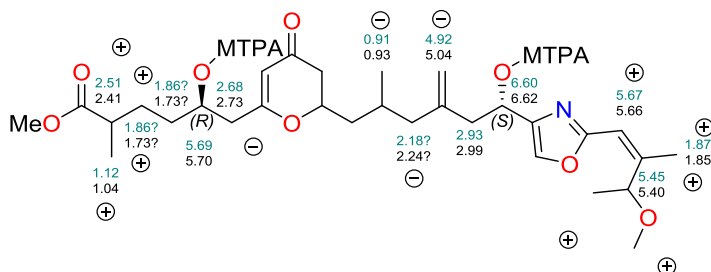
**b) Determinación de la estereoquímica absoluta de C17.**

Para determinar la estereoquímica absoluta de C17 en el compuesto **7**, se aplicó de nuevo el método de Mosher sobre el grupo hidroxilo en C17 del compuesto **8**, ya que la apertura del anillo de lactona de **7** no implica cambio en ninguno de los centros quirales.



**Figura 144.** Estructura con estereoquímica parcial del compuesto **7**.

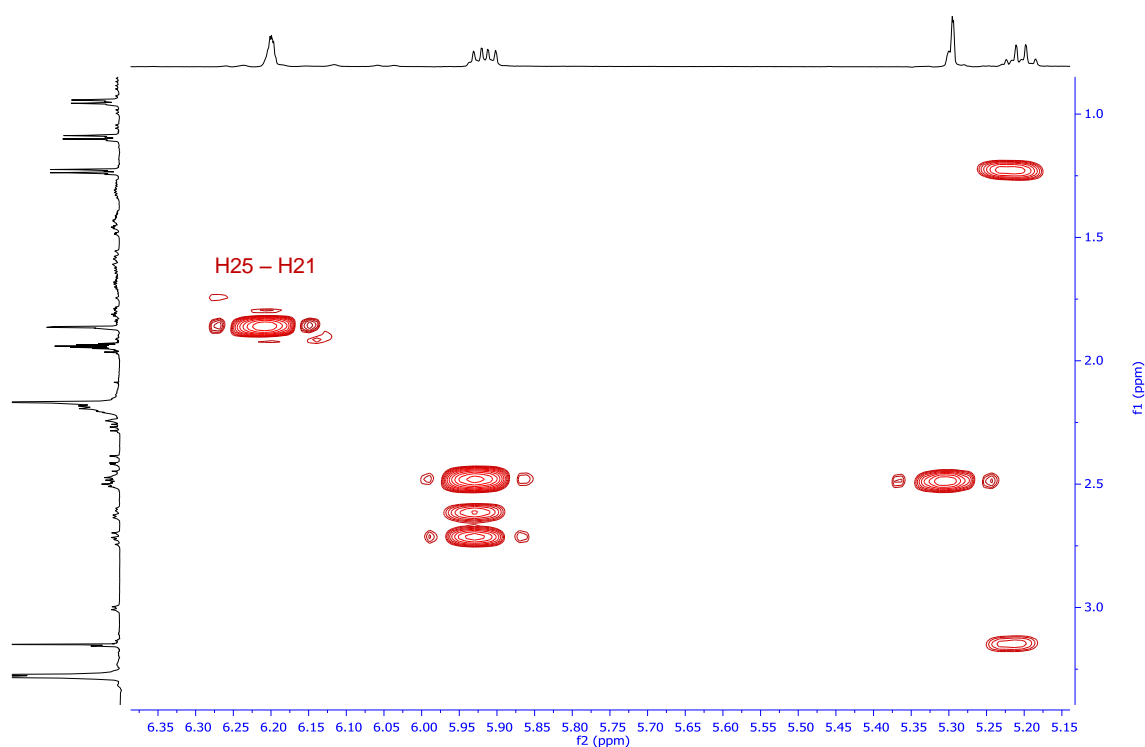
La esterificación del compuesto **8** con los reactivos quirales *R* y *S* del cloruro de ácido del MTPA permitió la obtención de los respectivos ésteres. El cálculo de los valores de las  $\Delta\delta$  (Figura 145) permitió establecer la estereoquímica absoluta en C17 como *S* y corroborar la del C5 como *R*.



**Figura 145.** Determinación de la configuración absoluta de C17 en el compuesto **8**.

**c) Determinación de la estereoquímica del doble enlace  $\Delta^{21}$ .**

El siguiente paso fue deducir la geometría del doble enlace  $\Delta^{21}$ . La correlación ROE entre H25 ( $\delta_H$  1.86) y H21 ( $\delta_H$  6.20) en el experimento bidimensional ROESY de **7** es indicativa de una geometría Z para dicho doble enlace.



**Figura 146.** Ampliación de las correlaciones clave experimento ROESY del compuesto **7**.

**d) Determinación de la estereoquímica de C11 y C13.**

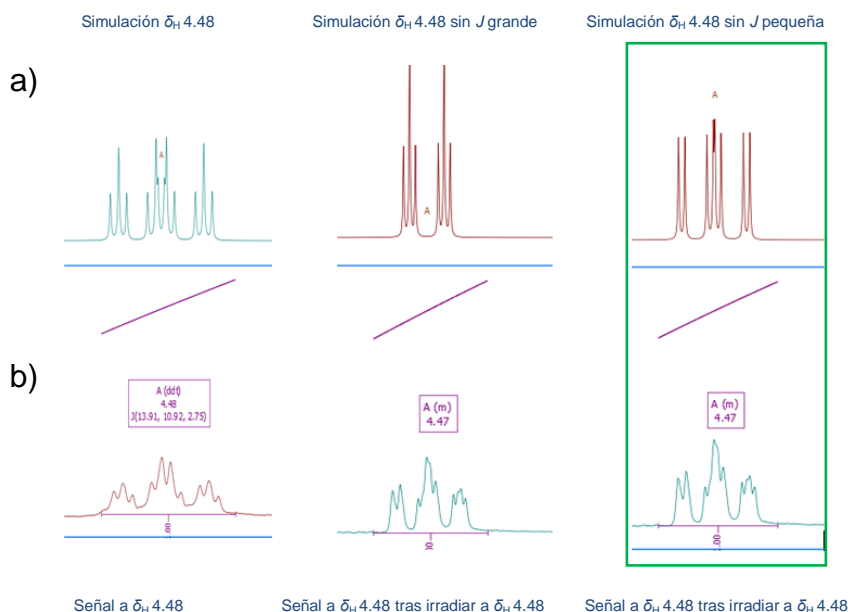
Para la determinación de la estereoquímica relativa entre C11 y C13 se realizó un estudio de las constantes de acoplamiento y de las correlaciones ROE observadas en el experimento  $^1H$ - $^1H$  ROESY de **7**.

d.1. Análisis entorno al enlace C11 - C12.

En primer lugar, se midieron las constantes de acoplamiento  $^3J_{HH}$  del sistema: H11/ H12<sub>h</sub>, H11/ H12<sub>i</sub>, H12<sub>h</sub>/H13 y H12<sub>i</sub>/H13. La medición directa de estas constantes no fue posible en el experimento ordinario de RMN  $^1H$  debido a la complejidad de la multiplicidad de estas señales, por lo que se recurrió a experimentos 1D-TOCSY e irradiaciones selectivas sobre el espectro “homodecoupling” de RMN de  $^1H$ .

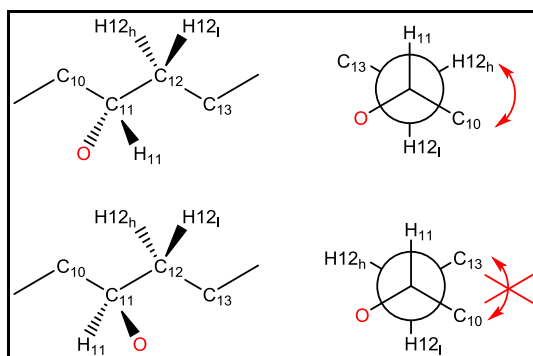
La multiplicidad dddd de la señal de H11 ( $\delta_H$  4.48) con constantes L/L/S/S (14.0, 10.9, 2.7, 2.7 Hz) era debida al acoplamiento con valores de  $J$  grandes y pequeñas (L/S) con H10 ( $\delta_H$  2.41;2.23) y también con H12 ( $\delta_H$  1.81;1.46). Cómo las constantes de acoplamiento de los protones de H10 ( $\delta_H$  2.41;2.23) con H11 ( $\delta_H$  4.48) eran 14.0 Hz y 2.7 Hz respectivamente, fue necesario asignar las constantes de  $J$  grandes y pequeñas (L/S) restantes entre H11 y los protones de H12.

Para ello, se planteó irradiar la señal H12<sub>h</sub> ( $\delta_H$  1.46), ya que viendo la constante que desaparece con H11 ( $\delta_H$  4.48) se podría deducir si es grande o pequeña. Desafortunadamente, al irradiar dicha señal, el software utilizado no pudo resolver el multiplete automáticamente. Como alternativa se procedió a simular el multiplete H11 ( $\delta_H$  4.48) resultante de eliminar las constantes de acoplamiento de 10.9 Hz y de 2.7 Hz por separado. Una vez obtenido los multipletes simulados, se compararon con los obtenidos experimentalmente. En la Figura 147 se muestra que el multiplete simulado obtenido al eliminar la constante pequeña, era similar al obtenido experimentalmente al irradiar a  $\delta_H$  1.46 (H12<sub>h</sub>) por lo que la  $J$  grande correspondía al acoplamiento que sufría con la señal de  $\delta_H$  1.81 (H12<sub>i</sub>).

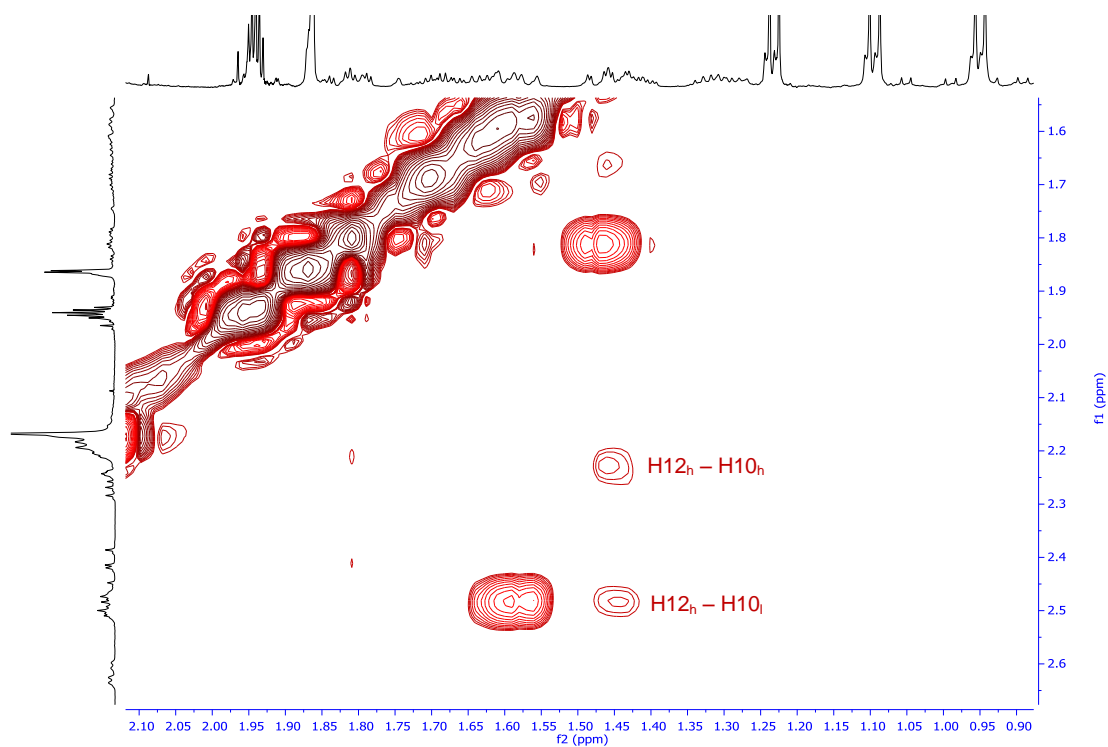


**Figura 148.** Comparativa de los multipletes simulados a) con el experimental b) tras irradiar  $\delta_H$  1.46.

Esta situación indicó que  $H_{12_l}$  ( $\delta_H$  1.81) está en posición *anti* con  $H_{11}$  ( $\delta_H$  4.48) mientras que  $H_{12_h}$  ( $\delta_H$  1.46) podría localizarse en cualquiera de las dos posiciones *gauche* que se muestra en la Figura 149. Para discernir entre las dos alternativas, se analizó el experimento bidimensional ROESY. La correlación ROE entre  $H_{12_h}$  ( $\delta_H$  1.46) y  $H_{10}$  ( $\delta_H$  2.41; 2.23) permitió establecer que estos protones se encuentran en disposición *gauche* y de esta forma se pudo establecer la configuración relativa entre C11 y C12 (Figura 150).



**Figura 149.** Posibles conformaciones entre C11 y C12 en el compuesto 7.



**Figura 150.** Ampliación de las correlaciones clave experimento ROESY del compuesto **7**.



d.2. Análisis entorno al enlace C12 - C13.

Para el enlace C12 y C13 se hizo una aproximación similar.

Como la única constante de acoplamiento de  $H_{12_h}$  ( $\delta_H$  1.46) es de 10.8 Hz, implicaba disposición *antiperiplanar* con  $H_{13}$  ( $\delta_H$  2.20) mientras que  $H_{12_l}$  ( $\delta_H$  1.81) con un valor pequeño se disponía en posición *gauche*.

Al igual que en el sistema anterior, fijadas las posiciones entre  $H_{12_h}$  ( $\delta_H$  1.46) y  $H_{13}$  ( $\delta_H$  2.20), existían dos escenarios posibles que se resolvieron mediante el estudio de las correlaciones ROE observadas (Figura 152) entre  $H_{12_l}$  ( $\delta_H$  1.81) y  $H_{27}$  ( $\delta_H$  0.95), además de la observada entre  $H_{11}$  ( $\delta_H$  4.48) y  $H_{14_l}$  ( $\delta_H$  2.49), donde sólo era compatible la primera opción.

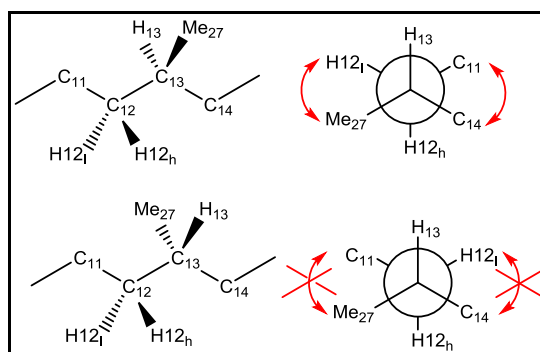
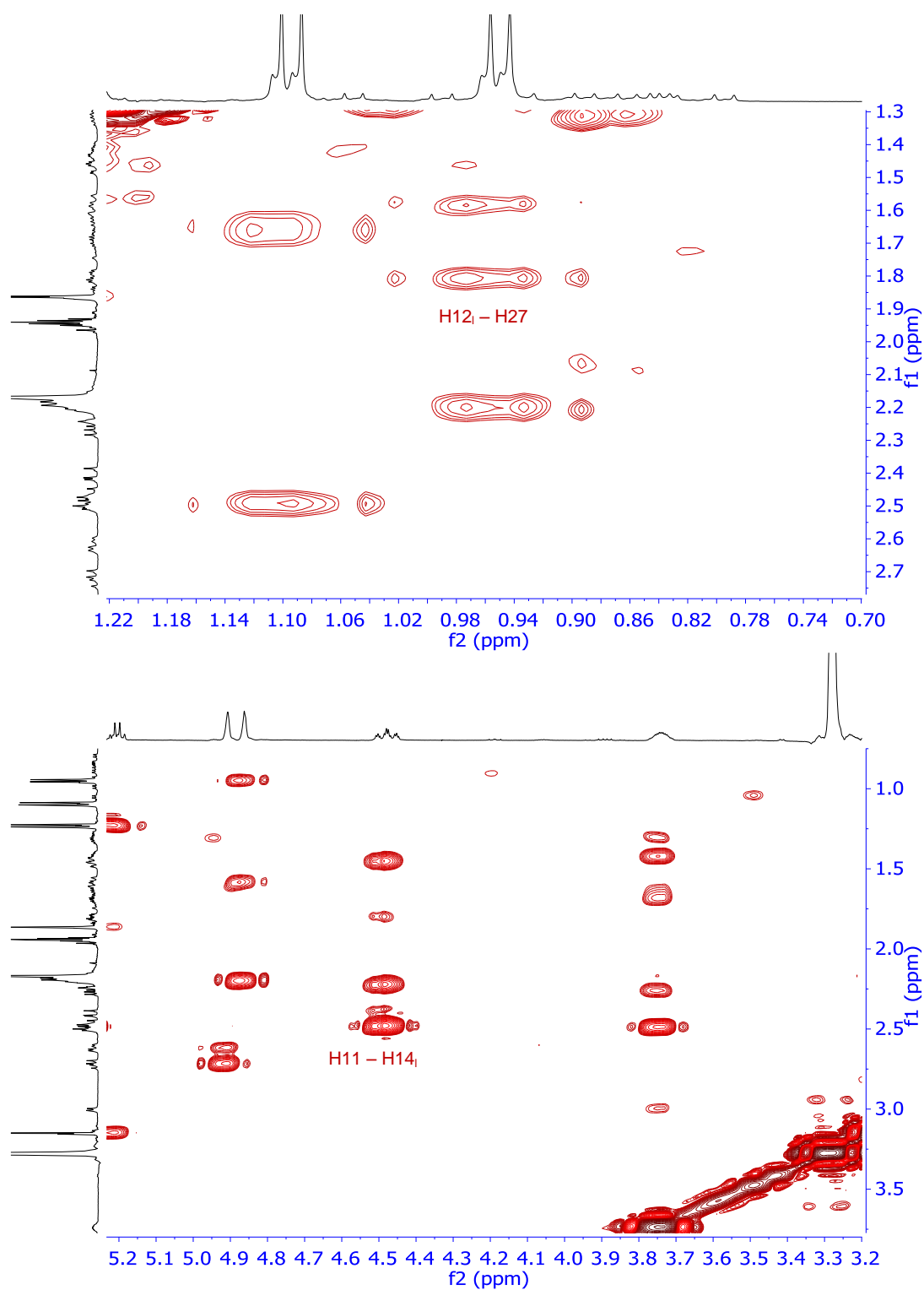


Figura 151. Posibles conformaciones entre C12 y C13 del compuesto 7.



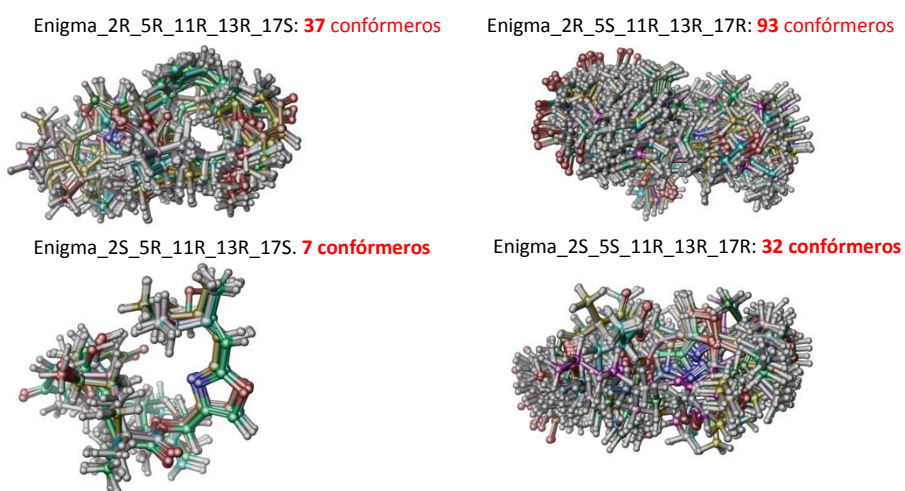
**Figura 152.** Ampliación de las correlaciones clave experimento ROESY del compuesto 7.

### e) Determinación de la estereoquímica de C23

La comparación de los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento del compuesto **7** con los de los enigmazoles ya descritos permitieron sugerir que poseían la misma estereoquímica en C23.

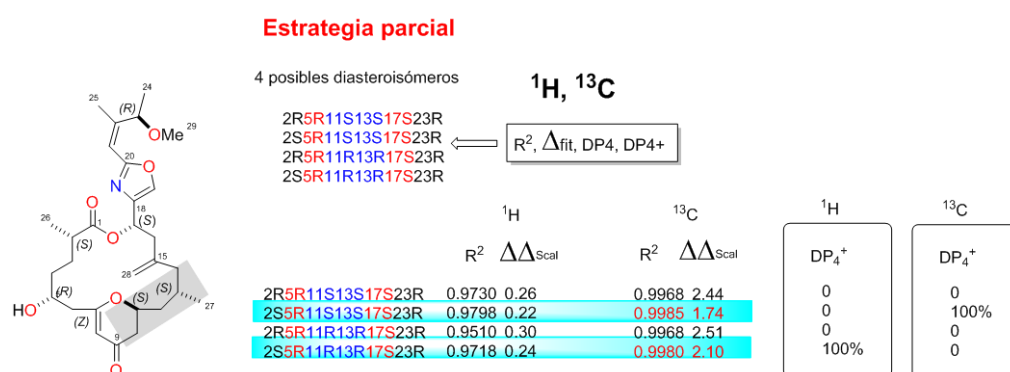
### f) Estereoquímica final del compuesto **7**.

Una vez establecida la estereoquímica absoluta de C5 (*R*) y C17 (*S*), la relativa entre C11 y C13 (*S*<sup>\*</sup>, *S*<sup>\*</sup>), y suponiendo inicialmente que el centro quiral en C23 de la cadena del oxazol era igual a la de los enigmazoles descritos, como 23*R*, se recurrió finalmente a cálculos computacionales para relacionar todos los centros quirales de **7** y resolver así su estructura tridimensional. De este modo, se plantearon los siguientes 4 diastereoisómeros: 2*R*5*R*11*R*13*R*17*S*23*R*, 2*S*5*R*11*R*13*R*17*S*23*R*, 2*R*5*R*11*S*13*S*17*S*23*R*, 2*S*5*R*11*S*13*S*17*S*23*R*. Se realizó la búsqueda conformacional con una ventana energética de 3 kcal/mol, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 153:



**Figura 153.** Estudio conformacional: estrategia parcial para **7**.

El cálculo de la energía/frecuencias de los confórmeros obtenidos se basó en la función B3LYP/6-31+G(d,p), donde se eliminaron los valores redundantes y aquellos confórmeros con frecuencias imaginarias. Mediante distribución de Boltzmann se calcularon los desplazamientos químicos usando el funcional MPW1PW91/6-311++G(2d,p). Al comparar los valores obtenidos mediante los cálculos estadísticos  $R^2$ , parámetros DP4 y DP4+, los resultados fueron los siguientes (Figura 154):



**Figura 154.** Resultados obtenidos mediante cálculos conformacionales DFT del compuesto **7**.

La comparación mediante DP4+ dio como más probable para **7** el diastereoisómero 2S,5R,11S,13S,17S,23R cuando se tenía en cuenta sólo los valores de  $^{13}\text{C}$ , mientras que resultaba como más probable el 2S,5R,11R,13R,17S,23R cuando se tenían en cuenta los valores de  $^1\text{H}$ . Teniendo en cuenta que el mejor ajuste para el primero mediante estadística bayesiana y ajuste por mínimos cuadrados, decantó la balanza a favor del diastereoisómero 2S5R11S13S17S23R como configuración total del compuesto **7**.

Una vez establecida la estructura de las moléculas aisladas, se realizó su estudio de citotoxicidad. Los resultados para **7** mostraron una moderada actividad citotóxica (Tabla 17), dando valores de  $GI_{50}$  9.9  $\mu$ M para pulmón (A-549), 18  $\mu$ M para colon (HT-29) y mama (MDA-MB-231), y de 87  $\mu$ M para páncreas (PSN-1).

**Tabla 17.** Actividad citotóxica del compuesto **7**.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	9.9 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
HT-29	18 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
MDA-MB-231	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
PSN-1	87 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M

El compuesto **8** resultó ser inactivo en el ensayo de actividad citotóxica, mientras que el compuesto **9** mostró unos valores de actividad ligeramente mayores que los obtenidos por el compuesto **7** (Tabla 18).

**Tabla 18.** Actividad citotóxica del compuesto **9**.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	1.4 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
HT-29	1.0 $\mu$ M	3.7 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
MDA-MB-231	4.1 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M
PSN-1	1.1 $\mu$ M	>19 $\mu$ M	>19 $\mu$ M

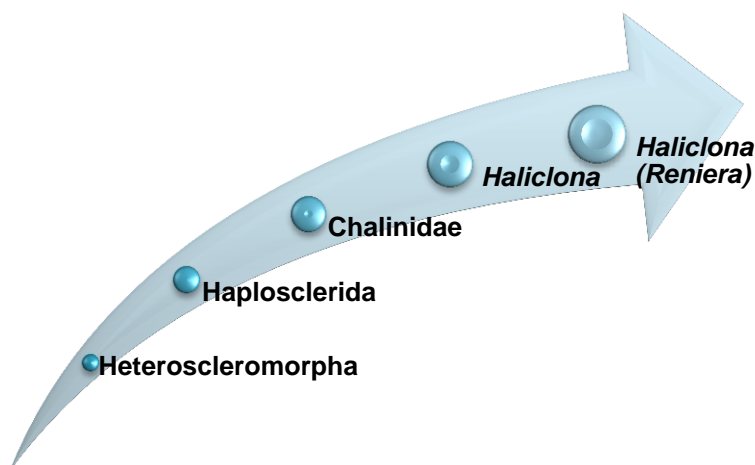
Teniendo en cuenta la facilidad con la que se realiza la apertura del ciclo durante el fraccionamiento en el caso de compuesto **7**, se podría proponer que la inactividad presentada por el compuesto **8** se deba a la formación del éster metílico. En el caso del compuesto **9**, cuya única diferencia con el posible compuesto **7** abierto sería la pérdida del hidroxilo sobre C5, podría influir ligeramente al aumento de la actividad de este.

Finalmente, los patrones de hidroxilación y metilación observados en estos macrociclos, son claramente indicativos de una biosíntesis basada en la ruta de los policétidos. El grupo oxazol, al menos en parte, sugiere un origen peptídico no ribosomal.

*CAPÍTULO VI*  
*HALICLONA (RENIERA)*  
*SP.*

## 6. ESTUDIO DE LA ESPONJA *HALICLONA* (*RENIERA*) SP.

La esponja del subgénero *Haliclona* (*Reniera*) pertenece al género *Haliclona*, familia Chalinidae, orden Haplosclerida dentro de la subclase Heteroscleromorpha, clase Demospongiae (Esquema 11). Poseen un esqueleto muy regular, delicado y sin espículas y habitualmente son suaves, comprensibles pero frágiles.<sup>119</sup>



**Esquema 11.** Clasificación de las esponjas del subgénero *Haliclona* (*Reniera*).

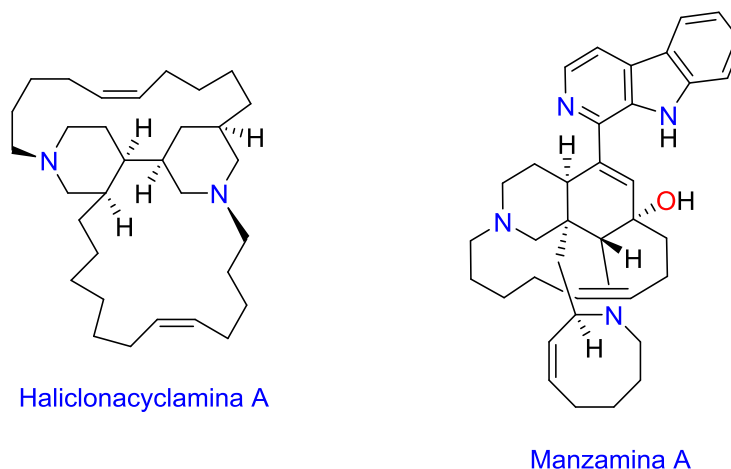
---

<sup>119</sup> *Systema Porifera*; Hooper, J. N. A.; Van Soest, R. W. M.; Willenz, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002.



### 6.1. Compuestos aislados con anterioridad

Las esponjas del género *Haliclona* han sido estudiadas extensamente. Se han descrito más de 200 compuestos,<sup>120</sup> entre los que se encuentran alcaloides terciarios citotóxicos como las haliclonacyclaminas (Figura 155),<sup>121</sup> alcaloides antifúngicos como la papuamina,<sup>122</sup> alcaloides citotóxicos como las manzaminas<sup>123</sup> o péptidos con propiedades antiinflamatorias como halipeptins.<sup>124</sup>



**Figura 155.** Compuestos aislados de esponjas pertenecientes al género *Haliclona*.

<sup>120</sup> Mansoor, T. A.; Shinde, P. B.; Luo, X.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Sim, C. J.; Son, B. W.; Jung, J. H. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1481–1486.

<sup>121</sup> Arai, M.; Ishida, S.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2009**, *57*, 1136–1138.

<sup>122</sup> Barrett, A. G. M.; Boys, M. L.; Boehm, T. L. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 685–699.

<sup>123</sup> Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1781–1791.

<sup>124</sup> Randazzo, A.; Bifulco, G.; Giannini, C.; Bucci, M.; Debitus, C.; Cirino, G.; Gomez-Paloma, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10870–10876.

6.2. Haliclona (Reniera) sp.

6.2.1 Identificación y clasificación

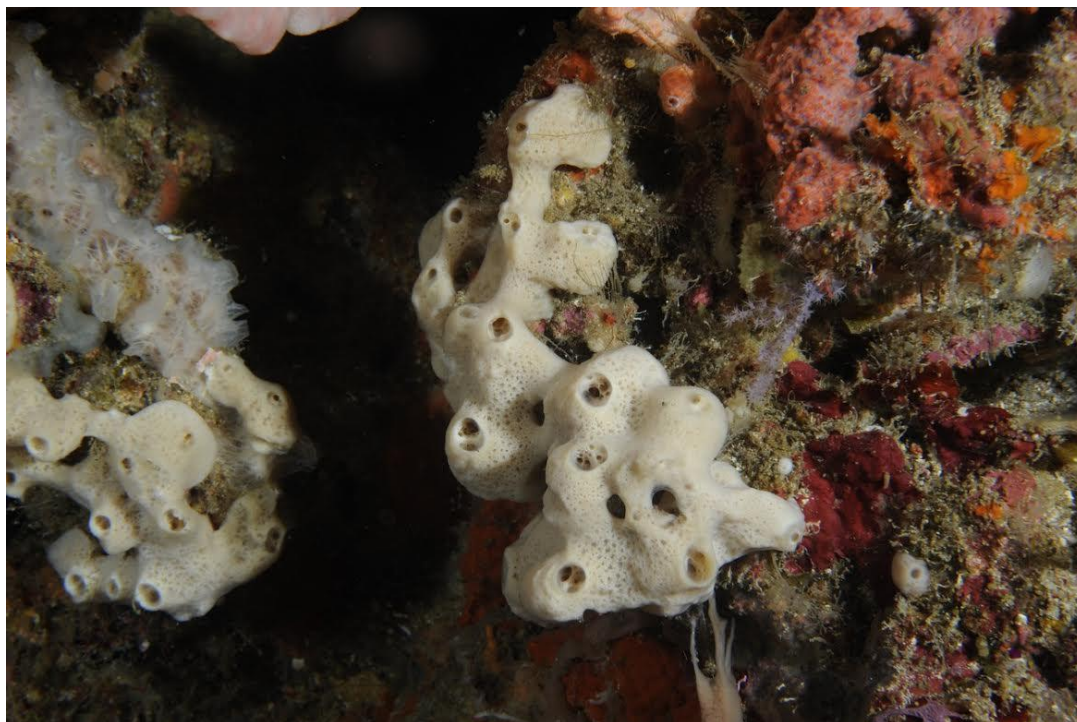


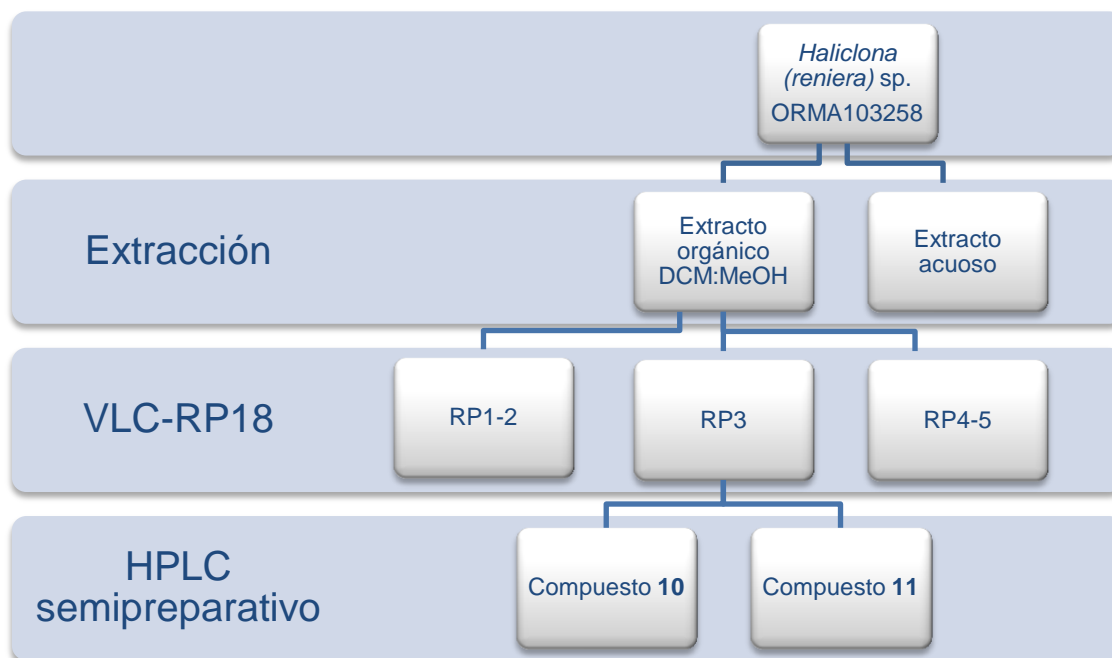
Figura 156. Fotografía de la esponja *Haliclona (reniera)* sp.

Durante la expedición en Timor Leste (Indonesia), en mayo de 2011, el equipo de expediciones de PharmaMar, recolectó un espécimen de *Haliclona (Reniera)* sp. (Figura 156) cerca del fondeadero de Tunumanu (125° 32.978' E 08° 17.994' S) mediante el uso del sistema de buceo rebreather a media profundidad. La esponja se clasificó taxonómicamente por la Dra. Maria Jesús Uriz Lespe del Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. La muestra se codificó como ORMA103258, estudiándose 28 g de los 30 g recolectados. Por otro lado, otro espécimen de la misma esponja *Haliclona (Reniera)* sp. fue recolectada en agosto de 2015, usando el método rebreather, cerca del caladero de Mapia (124°45.965' E/01°27.574'N) en Indonesia, a 40 m de profundidad. La muestra se codificó como ORMA142266, y de los 57 g recolectados, se estudiaron 43 g.

## 6.2.2. Extracción y fraccionamiento

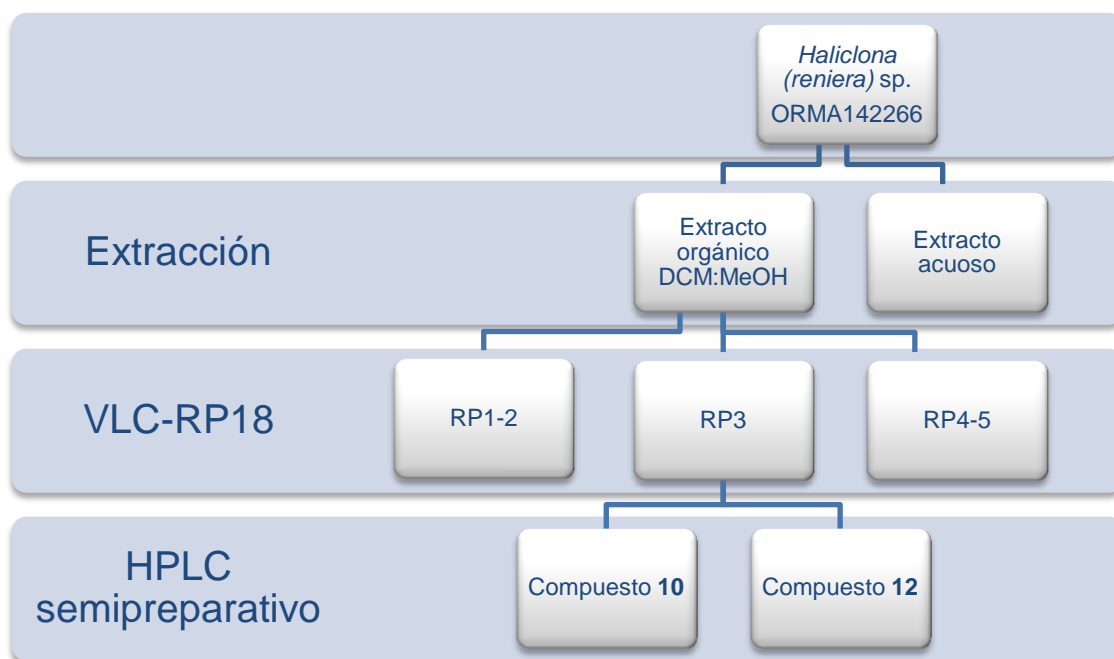
Las muestras, una vez troceadas por separado, se sometieron a dos extracciones; primero con metanol:diclorometano (1:1) y posteriormente con agua. Los extractos orgánicos se sometieron a un fraccionamiento a través de una placa filtrante con gel de sílice en fase reversa, y se eluyó con mezclas de disolventes en orden decreciente de polaridad (agua-metanol-diclorometano). Las fracciones metanólicas fueron las únicas que presentaron actividad citotóxica, por lo que se purificaron por HPLC en fase reversa. De la primera muestra recolectada se obtuvo el compuesto conocido halioxepina<sup>125</sup> (**10**, 13.7 mg) y el compuesto **11** (3.3 mg), que resultó ser un nuevo análogo de halioxepina. De la segunda muestra recolectada, se logró aislar, además de halioxepina (**10**, 2.0 mg), el compuesto **12** (7.5 mg) que también resultó ser otro nuevo análogo de halioxepina.

Todo el proceso de fraccionamiento y purificación viene recogido en los Esquema 12 y Esquema 13:



**Esquema 12.** Fraccionamiento del extracto orgánico de la primera muestra recolectada de la esponja *Haliclona (Reniera) sp* codificada como ORMA103258.

<sup>125</sup> Trianto, A.; Hermawan, I.; de Voogd, N. J.; Tanaka, J. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2011**, 59, 1311–1313.



**Esquema 13.** Fraccionamiento del extracto orgánico de la segunda muestra recolectada de la esponja *Haliclona (Reniera) sp* codificada como ORMA142266.

Para el fraccionamiento bioguiado se realizó un estudio de la actividad biológica citotóxica de las fracciones obtenidas en un panel de cuatro líneas celulares humanas tumorales: A-549 (pulmón), HT-29 (colon), MDA-MB-231 (mama) y PSN-1 (colon).

### 6.2.3. Determinación estructural

#### 6.2.3.1. Halioxepina (10)

En el espectro de masas de alta resolución del compuesto **10** se observó el ión  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  437.2655 correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{26}H_{38}O_4Na$  (calc. para  $C_{26}H_{38}O_5Na$   $m/z$  437.2662,  $\Delta m = 0.0007$  uma). En el espectro de masas de baja resolución (Figura 157) se observó, además del ión  $[M+Na]^+$ , los iones a  $m/z$  397 y 379, correspondientes a la pérdida de uno y dos grupos hidroxilos, respectivamente, y el ion a  $m/z$  851, asignado al fragmento  $[2M+Na]^+$ .

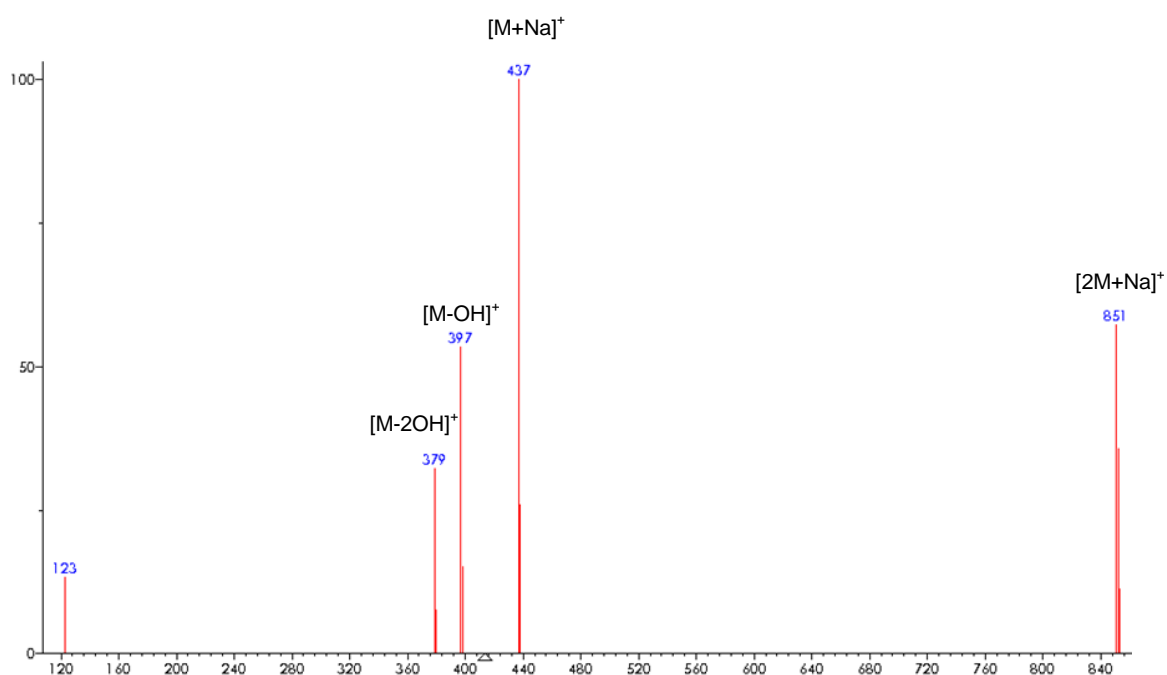


Figura 157. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **10**.

En el espectro de RMN de protón del compuesto **10** (Figura 158) se identificaron 5 grupos metilos singletes a  $\delta_H$  0.81, 0.82, 0.85, 1.60 y 1.77. Los dos últimos desplazamientos químicos indicaron que esos dos grupos metilos estaban enlazados a un doble enlace. Además, se identificó un anillo bencénico 1,2,5-trisustituido a partir de los desplazamientos correspondientes a los protones aromáticos a  $\delta_H$  6.57, 6.64 y 6.71, con los acoplamientos característicos de d (3.0), dd (8.6, 2.9) y d (8.6) respectivamente, indicando la presencia de dos OH fenólicos en posición *para* uno con respecto al otro, y un tercer sustituyente en posición *orto* a uno de los OH fenólicos.

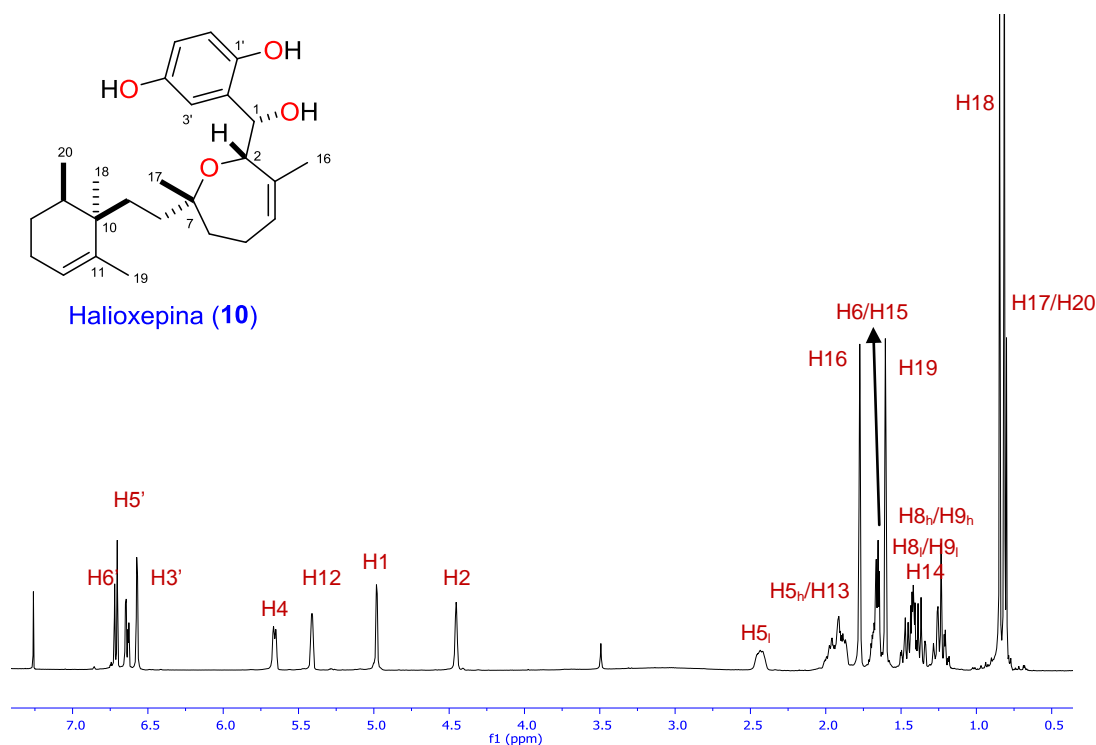
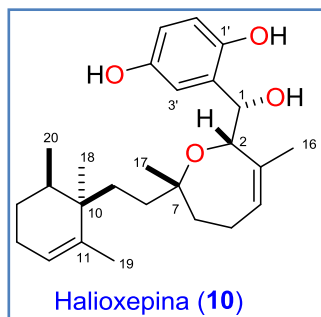


Figura 158. Espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ) del compuesto **10**.

A partir de estos datos, se realizó una búsqueda en la bibliografía con los siguientes criterios: compuesto con peso molecular 414 que posee cuatro metilos singletes, un metilo doblete y un anillo bencénico. Se obtuvo como resultado la halioxepina como única coincidencia, molécula descrita previamente por Junichi Tanaka y col.<sup>126</sup> Los desplazamientos químicos de **10** concordaron con los datos bibliográficos publicados para halioxepina (Tabla 19).

<sup>126</sup> Trianto, A.; Hermawan, I.; de Voogd, N. J.; Tanaka, J. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2011**, 59, 1311–1313.

**Tabla 19.** Comparativa de los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **10** con los publicados para halioxepina.

Pos.	Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2011, 59, 1311–1313	$\delta_{\text{H}}$ , compuesto 10
<b>1</b>	4.98	4.98
<b>2</b>	4.46	4.45
<b>3</b>	-	-
<b>4</b>	5.66	5.66
<b>5</b>	1.88	1.89
	2.43	2.43
<b>6</b>	1.66	1.65
<b>7</b>		
<b>8</b>	1.27	1.26
	1.49	1.49
<b>9</b>	1.24	1.23
	1.40	1.40
<b>10</b>	-	-
<b>11</b>	-	-
<b>12</b>	5.41	5.41
<b>13</b>	1.96	1.96
<b>14</b>	1.43	1.43
<b>15</b>	1.69	1.68
<b>16</b>	1.77	1.77
<b>17</b>	0.82	0.82
<b>18</b>	0.86	0.85
<b>19</b>	1.61	1.60
<b>20</b>	0.81	0.81
<b>1'</b>	-	-
<b>2'</b>	-	-
<b>3'</b>	6.57	6.57
<b>4'</b>	-	-
<b>5'</b>	6.64	6.64
<b>6'</b>	6.72	6.71

Aunque Tanaka y col. lograron calcular la estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en dos fragmentos de la molécula a los que vamos a denominar estereoclusters, separados por dos grupos metilenos, no pudieron determinar la relación estereoquímica que había entre ellos por lo que el compuesto fue publicado sin relación estereoquímica relativa entre los dos estereoclusters.

En nuestro caso, la realización de los espectros de RMN de halioxepina (**10**) en una mezcla de disolventes deuterados, y a través del estudio de las constantes de acoplamiento de los protones de la cadena C8-C9, así como los ROEs observados, nos permitió distinguir los desplazamientos químicos de los protones diastereotópicos de los metilenos que separan los dos estereoclusters y, consecuentemente, establecer la relación estereoquímica entre ellos.

Como en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de halioxepina (**10**) en cloroformo deuterado, las señales de los protones diastereotópicos de los metilenos se solapaban entre sí, por lo que impide la determinación de sus constantes de acoplamiento, se recurrió a repetir dicho espectro en una mezcla 9:1 de disolventes deuterados  $\text{C}_6\text{D}_6:\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . De esta forma se observó una separación clara de dichos protones en el espectro y determinar las constantes de acoplamiento para cada protón. La obtención de dos valores de constantes de acoplamiento  $^1\text{H}-^1\text{H}$  grandes, una de ellas geminal y una pequeña permitieron establecer la disposición alternada entre protones se muestra en la Figura 160.



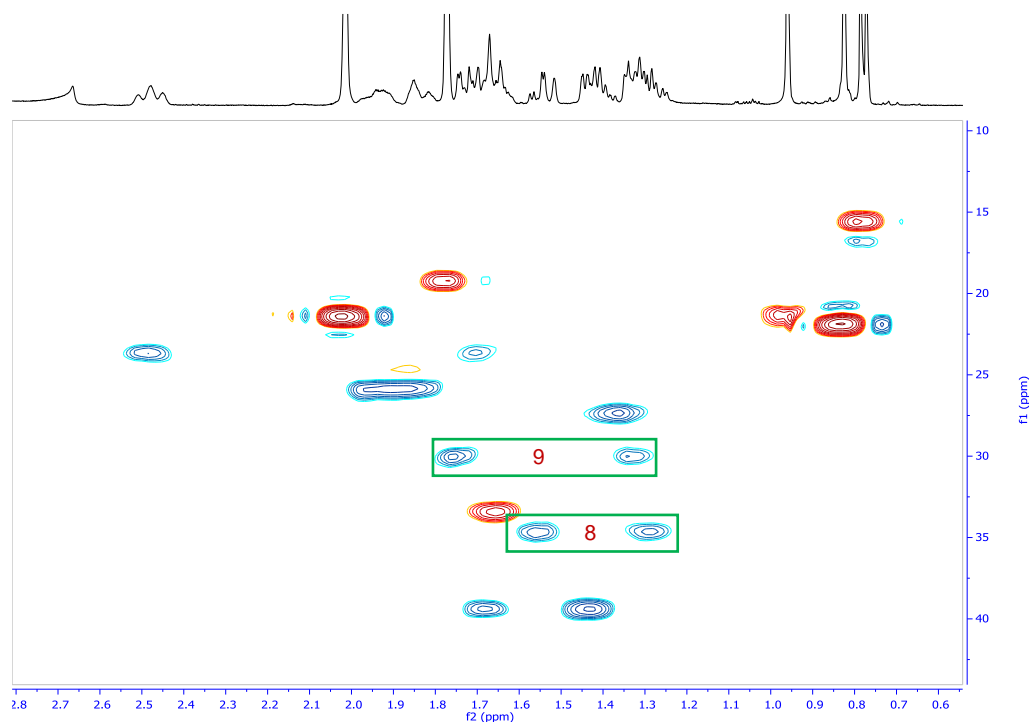


Figura 159. Ampliación HMQC de **3** en benceno/piridina deuterados (9:1)

Para asignar correctamente las constantes de acoplamiento, se realizaron experimentos de doble irradiación en donde se observó que la señal a  $\delta_H$  1.56 (H8: 13.4, 12.8 y 3.4 Hz), pasaba a tener sólo dos constantes grandes al irradiar la señal a  $\delta_H$  1.76, por lo que los metilenos debían estar dispuestos tal como se muestra en la Figura 160 apartado b):

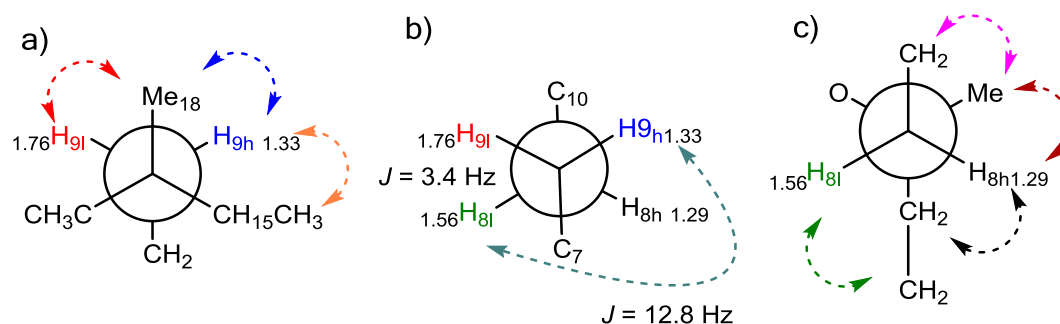


Figura 160. ROES observados en **3** en  $C_6D_6:C_5D_5N$  (9:1).

Una vez establecido la disposición alternada de los protones metilénicos con los carbonos C10 y C7 en posición *antiperiplanar*, las correlaciones ROE observadas en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY entre los protones del anillo de ciclohexano y H9 (Figura 160 apartado a) y los del anillo de tetrahidroxepina y H8 (Figura 160 apartado c), sólo pueden explicarse con la estereoquímica relativa  $1S^*2S^*7R^*10R^*15R^*$  mostrada en la Figura 161.

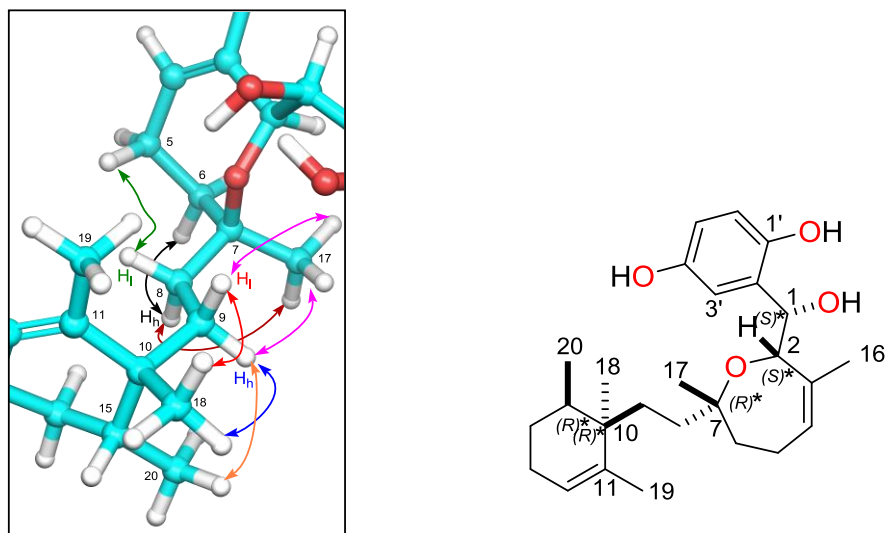


Figura 161. Estereoquímica relativa completa de halioxepina (**10**).

El compuesto **10** se envió a ensayo citotóxico, mostrando valores de  $\text{GI}_{50}$  de 8.7  $\mu\text{M}$  para la línea celular A-549, 7.0  $\mu\text{M}$  para HT-29, 13  $\mu\text{M}$  para MDA-MB-231 y 9.6  $\mu\text{M}$  para la línea PSN-1. Los valores de estos junto con los TGI y  $\text{LC}_{50}$  se recogen en la Tabla 20.

Tabla 20. Actividad citotóxica del compuesto **10**.

Línea celular	$\text{GI}_{50}$	TGI	$\text{LC}_{50}$
A549	8.7 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$	21 $\mu\text{M}$
HT-29	7.0 $\mu\text{M}$	12 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$
MDA-MB-231	13 $\mu\text{M}$	18 $\mu\text{M}$	21 $\mu\text{M}$
PSN-1	9.6 $\mu\text{M}$	13 $\mu\text{M}$	17 $\mu\text{M}$

### 6.2.3.2. Halioxepine B (11)

El compuesto **11** se eluyó en HPLC con un tiempo de retención menor que el compuesto **10**. Su espectro de masas de alta resolución mostró el ión  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  455.2713 que se corresponde a la fórmula molecular  $C_{26}H_{40}O_5Na$  (calc. para  $C_{26}H_{40}O_5Na$   $m/z$  455.2768,  $\Delta m = 0.0055$  uma). En su espectro de masas de baja resolución (Figura 162), además del ión  $[M+Na]^+$ , se observaron, como en el compuesto **10**, las pérdidas de uno y dos grupos OH a  $m/z$  397 y 379, respectivamente, que sugirieron claramente que se trata de un compuesto similar.

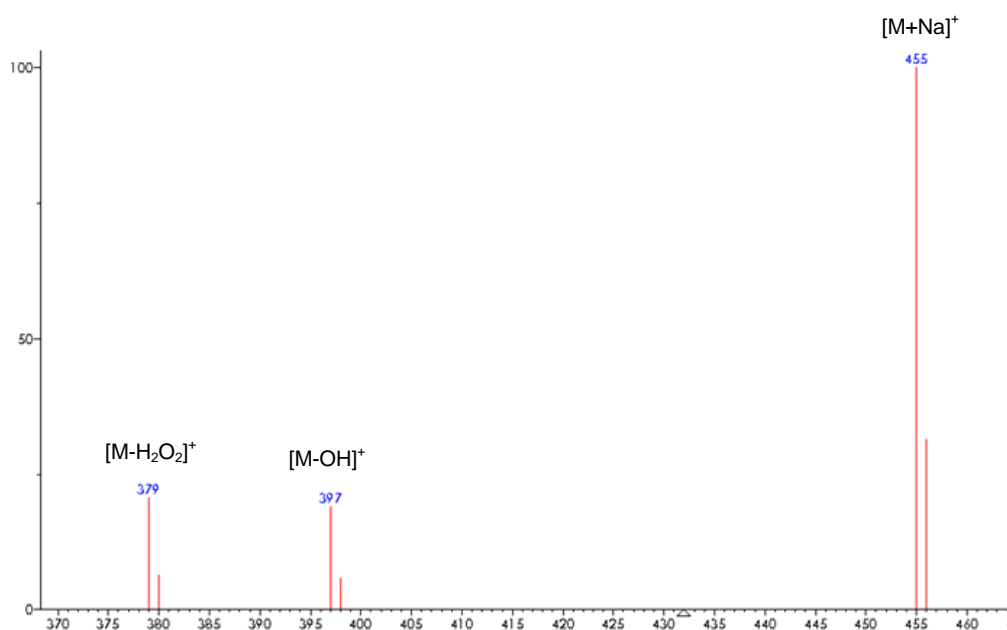


Figura 162. Espectro de masas ESI de baja resolución modo ión positivo del compuesto **11**.

Mediante el estudio de los experimentos RMN  $^1\text{H}$  (Figura 163), RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 164) y HSQC-editado (Figura 165) del compuesto **11** se determinó que contenía cuatro carbonos cuaternarios  $sp^2$  ( $\delta_{\text{C}}$  150.8, 148.2, 138.7 y 131.3), cuatro metinos  $sp^2$  ( $\delta_{\text{H}}$  6.86 /  $\delta_{\text{C}}$  116.3, 6.56/116.4, 6.52 /114.8 característicos de un anillo de benceno trisustituido, y 5.59/129.6 propio de un doble enlace trisustituido). Además se observaron señales de tres carbonos no protonados con hibridación  $sp^3$  ( $\delta_{\text{C}}$  78.0, 74.3 y 36.0), los dos primeros característicos de carbonos unidos a oxígeno, siete metilenos  $sp^3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.39;1.80 /  $\delta_{\text{C}}$  24.4, 1.81;1.34 /19.5, 1.69;1.29 / 44.8, 1.67;1.58 /40.0, 1.67;1.34/42.0, 1.60;1.07/ 21.1 y 1.39;1.18 /43.2), tres metinos  $sp^3$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.25 /  $\delta_{\text{C}}$  72.0, 4.41/ 75.4 y 0.75 /55.7, los dos primeros unidos a átomos de oxígeno) y cinco grupos metilo ( $\delta_{\text{H}}$  1.88 /  $\delta_{\text{C}}$  21.2, 1.21 /31.6, 0.96 /22.0, 0.79/32.5 y 0.55/21.3 uno de los cuales está situado sobre un doble enlace). Los desplazamientos se recogen en la Tabla 21.

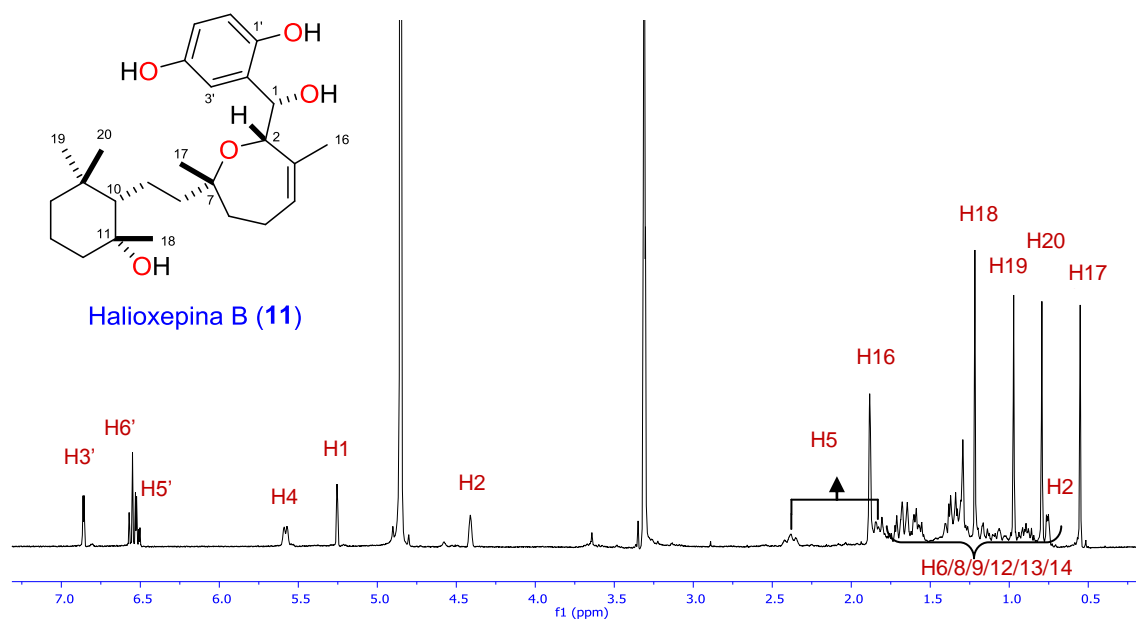


Figura 163. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 11.

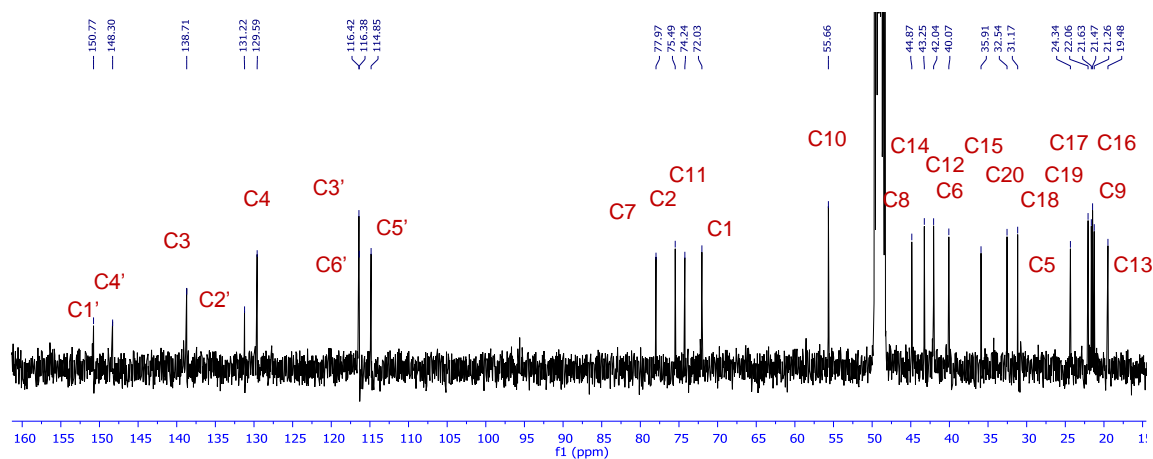
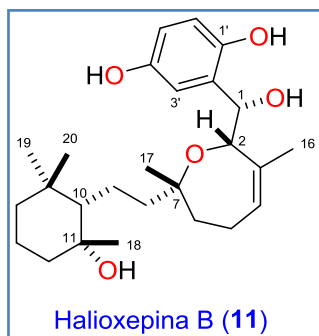


Figura 164. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 11.

**Tabla 21.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de halioxepina B (**11**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Pos.	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ , mult ( $J$ in Hz)
<b>1</b>	72.0, CH	5.25, d (1.7)
<b>2</b>	75.4, CH	4.41, br s
<b>3</b>	138.7, C	
<b>4</b>	129.6, CH	5.59, d (8.0)
<b>5</b>	24.4, $\text{CH}_2$	2.39, dd (14.7, 14.7) 1.80, m
<b>6</b>	40.0, $\text{CH}_2$	1.67, m 1.58, m
<b>7</b>	78.0, C	
<b>8</b>	44.8, $\text{CH}_2$	1.69, m 1.29, m
<b>9</b>	21.1, $\text{CH}_2$	1.60, m 1.07, m
<b>10</b>	55.7, CH	0.75, dd (5.0, 2.4)
<b>11</b>	74.3, C	
<b>12</b>	42.0, $\text{CH}_2$	1.67, m 1.34, m
<b>13</b>	19.5, $\text{CH}_2$	1.81, m 1.34, m
<b>14</b>	43.2, $\text{CH}_2$	1.39, m 1.18, m
<b>15</b>	36.0, C	
<b>16</b>	21.2, $\text{CH}_3$	1.88, s
<b>17</b>	21.3, $\text{CH}_3$	0.55, s
<b>18</b>	31.6, $\text{CH}_3$	1.21, s
<b>19</b>	22.0, $\text{CH}_3$	0.96, s
<b>20</b>	32.5, $\text{CH}_3$	0.79, s
<b>1'</b>	150.8, C	
<b>2'</b>	131.3, C	
<b>3'</b>	116.3, CH	6.86, d (2.8)
<b>4'</b>	148.2, C	
<b>5'</b>	114.8, CH	6.52, dd (8.6, 2.8)
<b>6'</b>	116.4, CH	6.56, d (8.5)

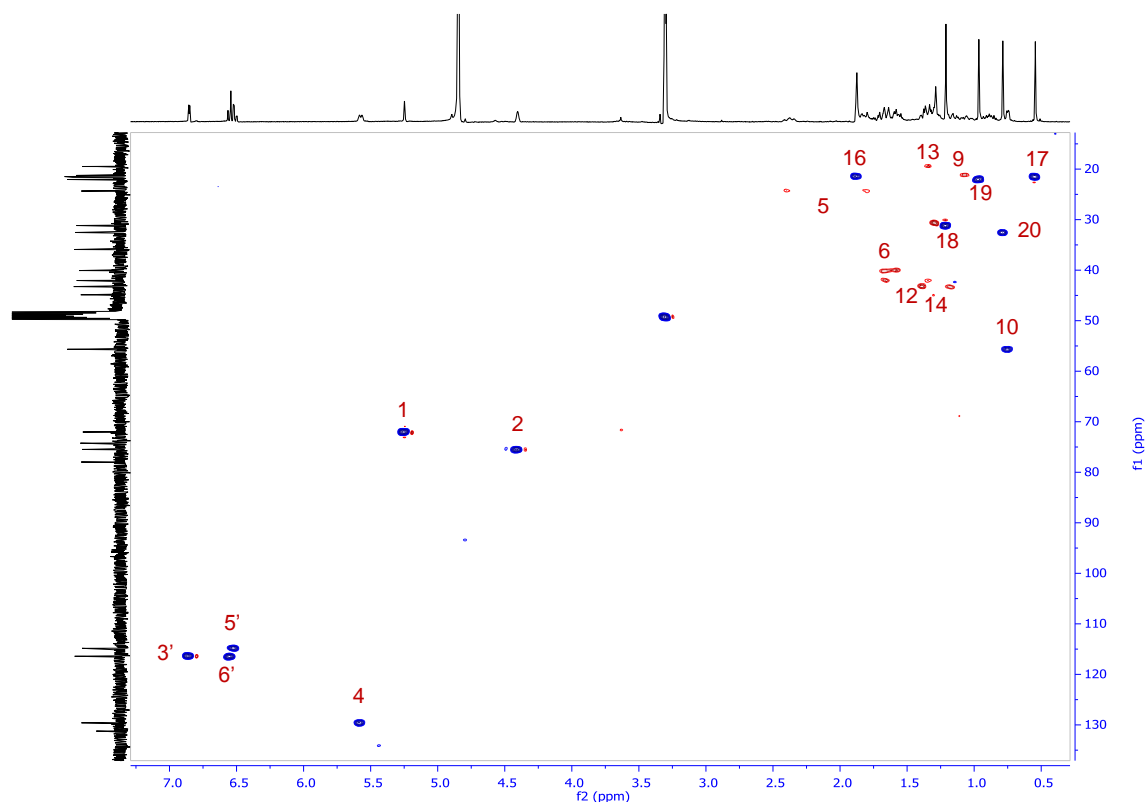
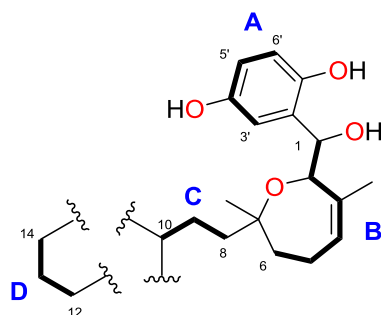


Figura 165. Espectro HSQC-editado (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 11.

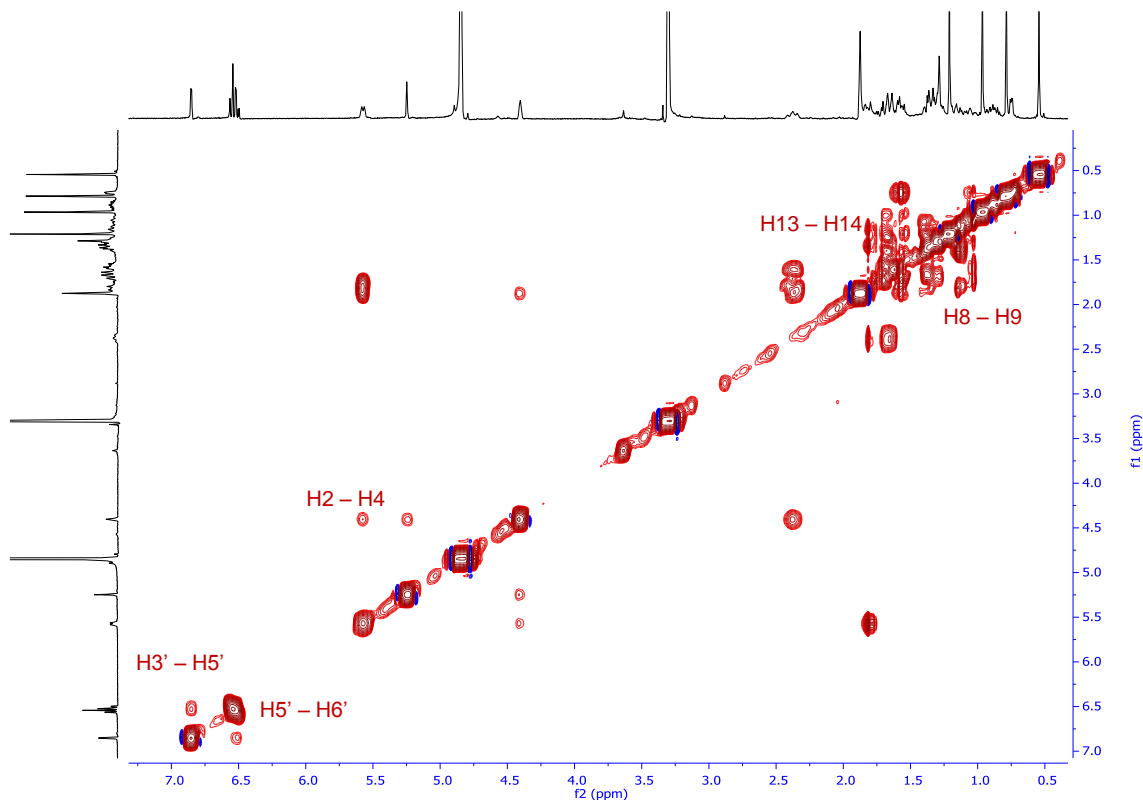
En el experimento de RMN bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 167), se observó que las señales del anillo aromático H6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.56), H5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.52) y H3' ( $\delta_{\text{H}}$  6.86), con multiplicidades de d (8.5), dd (8.6, 2.8) y d (2.8) respectivamente, pertenecían a un anillo bencénico 1,2,5-trisustituido (sistema de espín **A**). En este mismo experimento, se asignó también el sistema de espín **B** formado por H6 ( $\delta_{\text{H}}$  1.67; 1.58), H5 ( $\delta_{\text{H}}$  2.39; 1.80), H4 ( $\delta_{\text{H}}$  5.59), H2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.41) y H1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.25), incluyendo la correlación vinílica protón-protón entre H4 ( $\delta_{\text{H}}$  5.59) y H2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.41). Por último, se asignaron otros dos sistemas de espín formados por H9 ( $\delta_{\text{H}}$  1.60; 1.07) y H8 ( $\delta_{\text{H}}$  1.69; 1.29) (**C**) y por H14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.39; 1.18), H13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.81; 1.34) y H12 ( $\delta_{\text{H}}$  1.67; 1.34) (**D**). Estos sistemas de espín se resumen en la Figura 166.

Los sistemas de espín observados se muestran en la Figura 166.



**Figura 166.** Sistemas de espín y correlaciones observadas en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto 11.

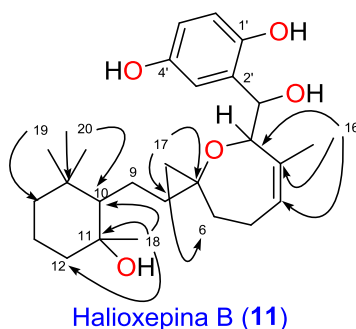
Todos estos datos confirmaron que la estructura del compuesto **11** es muy similar a la de **10**, ya que contiene los anillos de dihidroquinona, de tetrahydroxepina y una cadena alifática formada por dos grupos metileno, también presentes en el compuesto **10**, por lo que la única diferencia debe de estar en el anillo de seis miembros incluido en el sistema de espín **D**.



**Figura 167.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 11.



Debido a que no se observan más señales de carbono  $sp^2$ , se concluyó que el anillo que falta debe ser totalmente saturado, es decir, un ciclohexano. Con el fin de establecer la sustitución de este anillo de ciclohexano es necesario colocar tres grupos metilo que aparecen en el espectro de RMN  $^1H$  como singletes. Para ello se recurrió al experimento de RMN bidimensional HMBC (Figura 169). En dicho experimento se observaron correlaciones a larga distancia entre los protones de los grupos metilos **Me19** ( $\delta_H$  0.96) y **Me20** ( $\delta_H$  0.79) con los carbonos C10 ( $\delta_C$  55.7), C15 ( $\delta_C$  36.0) y C14 ( $\delta_C$  43.2), característicos de un sistema gem-dimetílico. Las correlaciones HMBC entre el metilo **Me18** ( $\delta_H$  1.21) y los carbonos C11 ( $\delta_C$  74.3), C10 ( $\delta_C$  55.7) y C12 ( $\delta_C$  42.0) permitieron localizarlo sobre C11. Estas correlaciones nos ayudaron a completar la sustitución del anillo de ciclohexano y establecer la estructura plana del compuesto **11** tal como se muestra en la Figura 168.



**Figura 168.** Estructura plana del compuesto **11** y las correlaciones claves observadas en su experimento de HMBC.

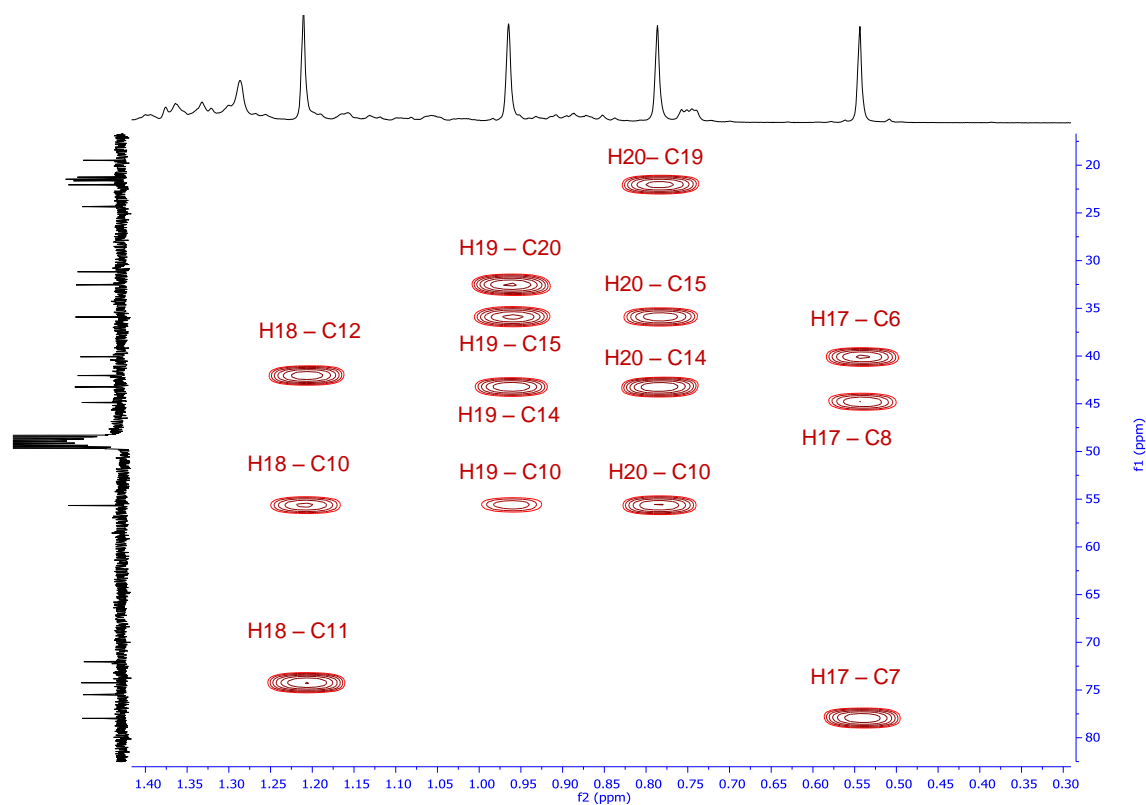


Figura 169. Espectro ampliado HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del compuesto **11**.

Las correlaciones observadas en el experimento bidimensional HMBC de **11** entre los metilos de la molécula y los carbonos cercanos, se recogen en la Figura 170.

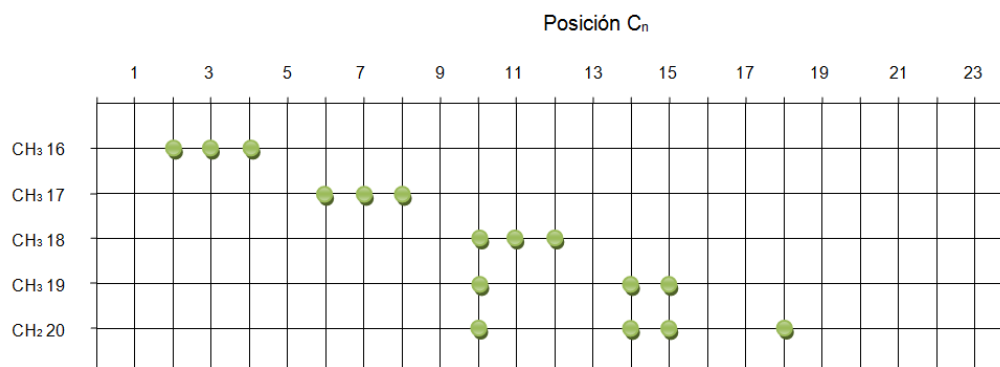


Figura 170. Correlaciones más importantes del experimento HMBC del compuesto **11**.

Para estudiar la estereoquímica relativa del compuesto **11**, la molécula se dividió en dos fragmentos o estereoclusters para simplificar su resolución. El estereocluster **A** contiene los dos centros quirales del anillo de ciclohexano, mientras que el estereocluster **B** contendría los del anillo de tetrahidroxepina unida por un grupo CHOH a la dihidroquinona (Figura 171). Los dos estereoclusters están separados por dos grupos metilenos.

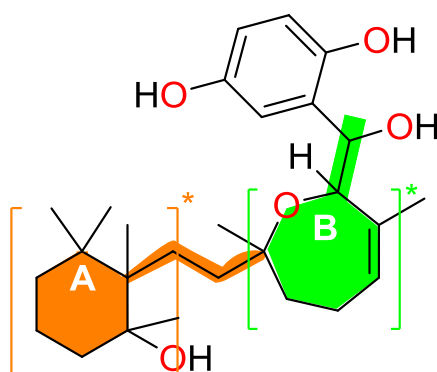
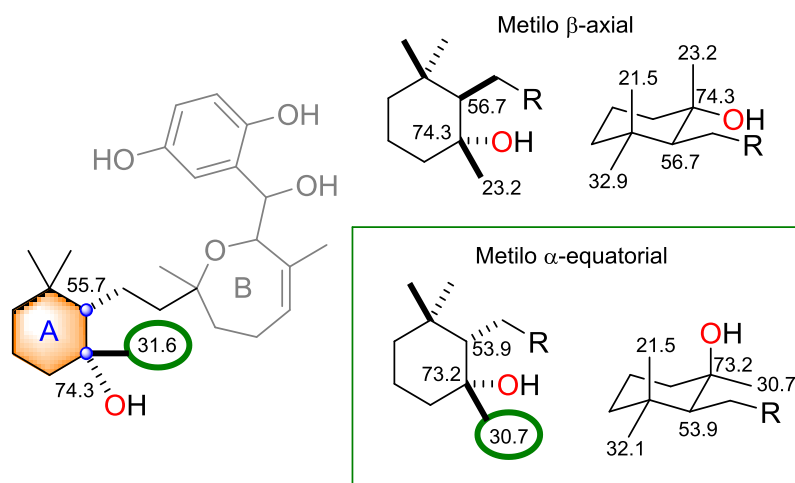


Figura 171. Estereoclusters A y B del compuesto 11.

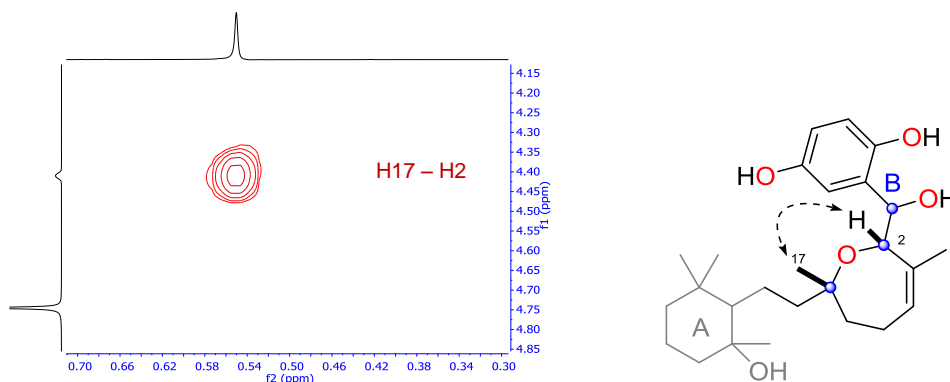
Para la determinación de la estereoquímica relativa del estereocluster **A** se realizó una revisión bibliográfica de modelos con anillos de ciclohexano que poseyeran la misma sustitución. La comparación de los desplazamientos de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **11** con dichos modelos permitieron determinar la configuración relativa de los centros quirales en **A** tal como se muestra en la Figura 172.<sup>127</sup> Así, el desplazamiento químico del grupo metilo C18 en **11** a 31.6 ppm es concordante con la de grupos metilo en posición  $\alpha$ -ecuatorial, cuyo desplazamiento es alrededor de 30.7 ppm, en vez de su disposición  $\beta$ -axial donde los desplazamientos químicos son entorno a 23.2 ppm.



**Figura 172.** Comparación de los desplazamientos químicos de carbono del estereocluster **A** en **11** con los de modelos similares de anillos de ciclohexano sustituido.<sup>127</sup>

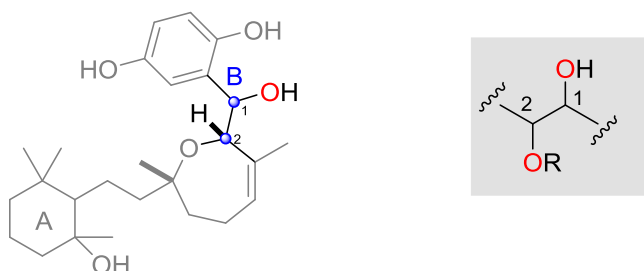
<sup>127</sup> M. Nishizawa, H. Takenaka, Y. Hayashi, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 806–813.

La determinación de la estereoquímica relativa del estereocluster **B** se realizó por partes. Por una parte, el ROE observado en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY de **11** entre H17 ( $\delta_{\text{H}}$  0.55) y H2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.41) mostrado en la Figura 173, indicó que ambos estaban situados hacia la misma cara de la molécula.



**Figura 173.** Ampliación del  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY del compuesto **11** y correlación espacial NOE observada entre los protones H25 y H14.

Por otra parte, la estereoquímica relativa entre los centros quirales en C1 ( $\delta_{\text{C}}$  72.0) y C2 ( $\delta_{\text{C}}$  75.4) se determinó mediante la aplicación del método de Murata,<sup>128</sup> ya comentado en el Capítulo I. De esta forma, se analizaron las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares de este sistema 1,2 dioxigenado en **11** (Figura 174) y se compararon con los valores teóricos de los conformeros alternados mayoritarios correspondientes a los isómeros de configuración *sin* o *anti*.



**Figura 174.** Estudio de la configuración de los centros C14 y C15.

<sup>128</sup> Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.

La constante de acoplamiento protón-protón entre H1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.25) y H2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.41) de 1.7 Hz (ver Tabla 21) indicó que ambos protones se disponían en posición *gauche*, por lo que fue necesario recurrir a las constantes de acoplamiento heteronucleares  $^2J_{\text{CH}}$  y  $^3J_{\text{CH}}$ . Mediante el experimento HSQC-HECADE (Figura 175), se midieron las constantes  $^2J_{\text{C2H1}}$  y  $^2J_{\text{C1H2}}$  donde ambas presentaron un valor pequeño (ver Figura 176).

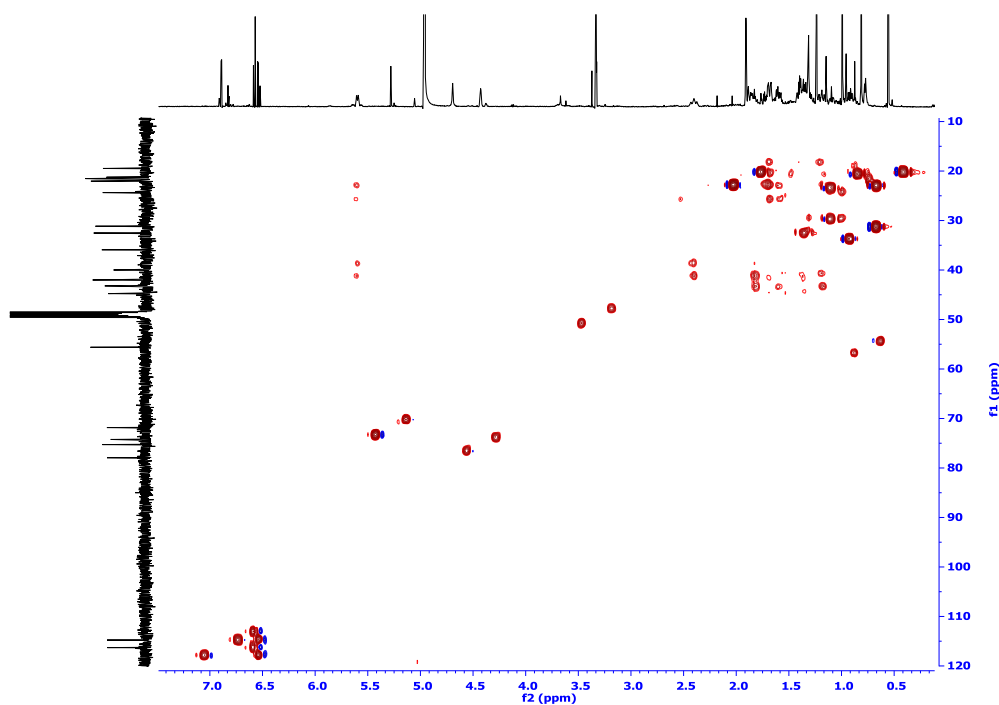


Figura 175. HSQC-HECADE del compuesto 11 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

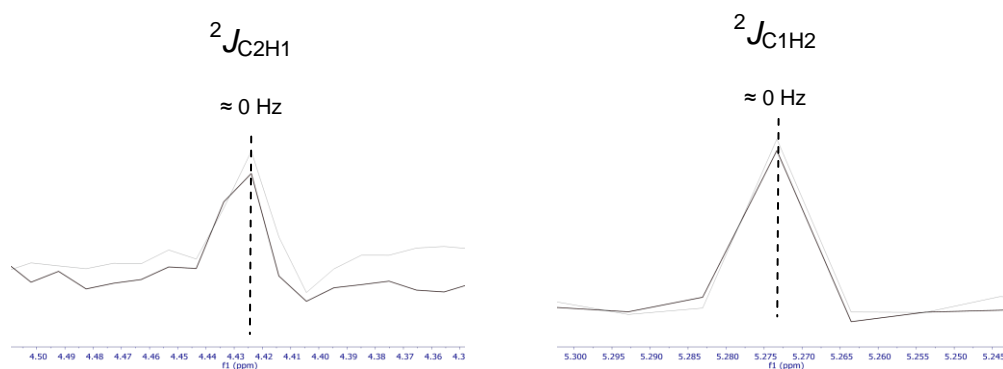


Figura 176. Trazas superpuestas de los componentes  $\alpha$  y  $\beta$  de  $^2J_{\text{C2H1}}$  y  $^2J_{\text{C1H2}}$ .

Con estos datos se compararon las constantes experimentales de  $^3J_{\text{H1H2}}$ ,  $^2J_{\text{C1H2}}$  y  $^2J_{\text{C2H1}}$ , todas ellas pequeñas, con los valores teóricos de los rotámeros *gauche* (Figura 177).

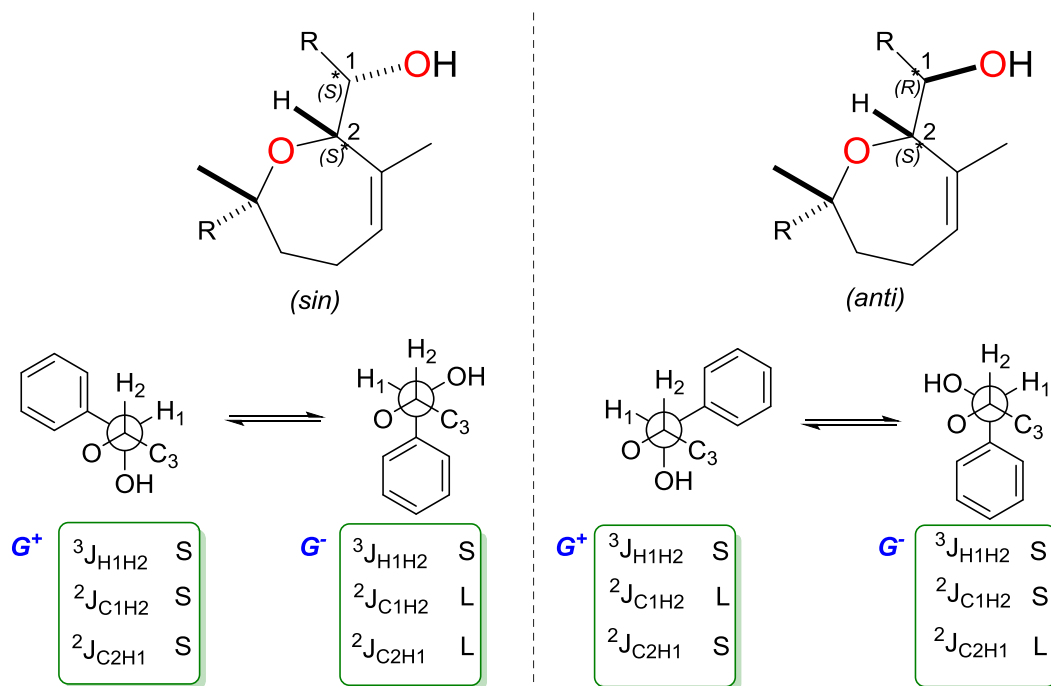


Figura 177. Posibles conformeros *gauche* alternados de configuración *sin* o *anti* para el fragmento C1-C2.

Como las tres constantes medidas experimentalmente son pequeñas, la única combinación que explica estos valores corresponde con la forma *gauche*<sup>+</sup> del isómero *sin*, por lo que la estereoquímica relativa debe ser 1*S*\*2*S*\*. De este modo, se estableció que la estereoquímica relativa del fragmento B es 1*S*\*,2*S*\*,7*R*\* tal como se muestra en la Figura 178.

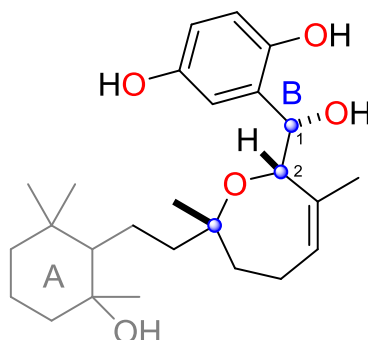
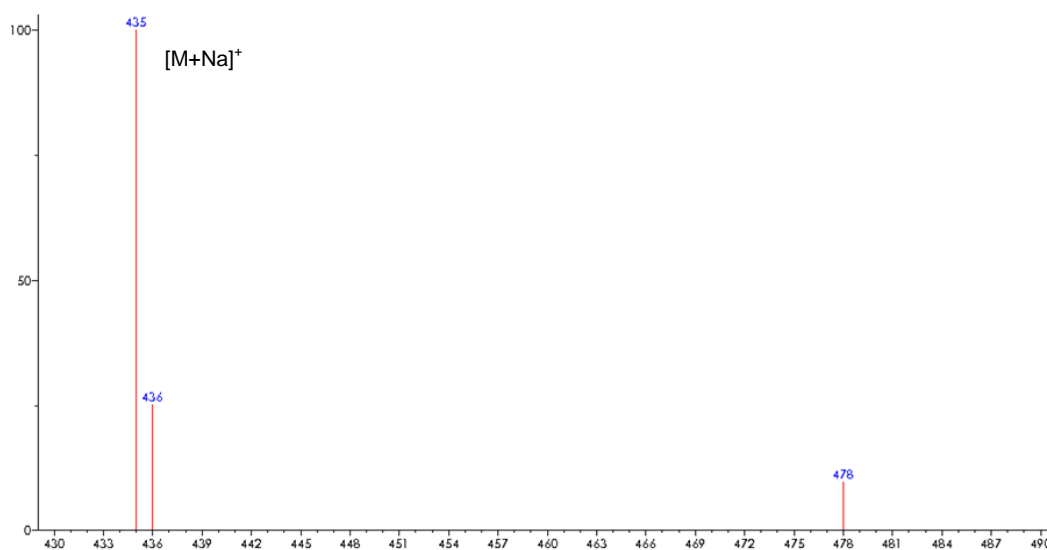


Figura 178. Estereoquímica relativa del fragmento B.

Llegados a este punto, aunque se pudo elucidar la estereoquímica relativa de los centros quirales dentro de cada uno de los estereoclusters **A** y **B**, la configuración relativa que existe entre ambos está todavía pendiente de determinar. Este punto se resolverá más adelante.

**6.2.3.3. Halioxepina C (12)**

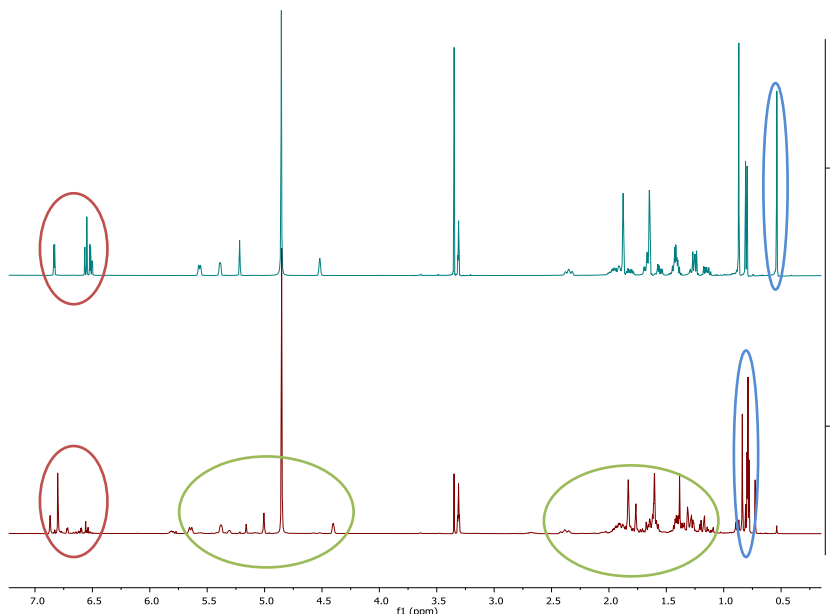
El compuesto **12** se eluyó en HPLC con un tiempo de retención de 37.6 min, frente a los 33.9 min del compuesto **10**. Su espectro de masas de alta resolución presentó el ion  $[M+H]^+$  a  $m/z$  412.2652 que se corresponde con una fórmula molecular de  $C_{26}H_{35}O_4$  (calc. para  $C_{26}H_{36}O_4$   $m/z$  412.2614,  $\Delta m = 0.0038$  uma). En su espectro de masas de baja resolución (Figura 179) se detectó también el ion  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  435.



**Figura 179.** Espectro de masas de baja resolución del compuesto **12**.

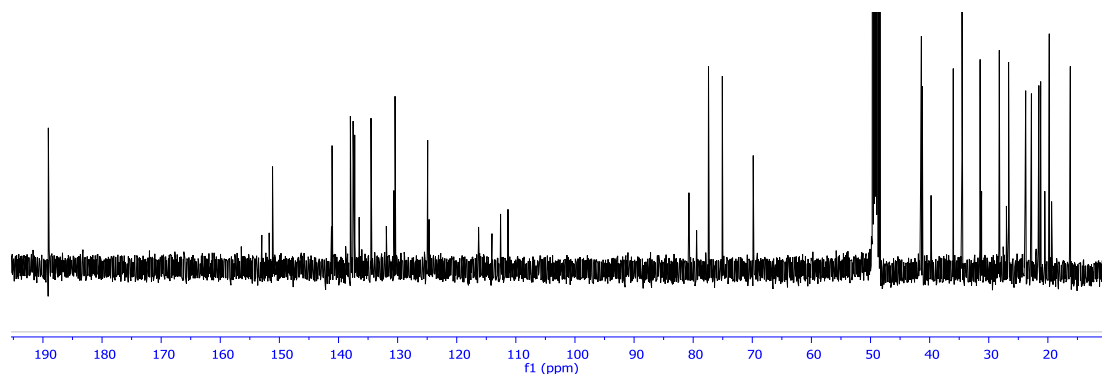


El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **12** (Figura 180) resultó ser muy similar al del compuesto **10**.



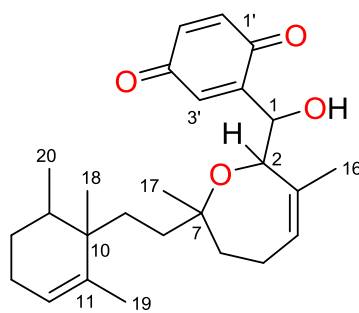
**Figura 180.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **10** (arriba) y **12** (abajo). Verde = señales similares, azul = señales desplazadas, rojo = señales diferentes.

Mientras que las regiones comprendidas entre 1.0-2.5 ppm y 4.0-6.0 ppm eran idénticas, el metilo C17 ( $\delta_{\text{H}}$  0.54) de **12** está desplazado a campo más bajo en relación con el de **10** ( $\delta_{\text{H}}$  0.79). Sin embargo, la mayor diferencia se observa en la región aromática. Las tres señales correspondientes a los tres protones del anillo aromático ( $\delta_{\text{H}}$  6.51, 6.56 y 6.83) de **10** se han convertido en un singlete ancho que integra por dos protones ( $\delta_{\text{H}}$  6.80) y otra señal triplete con  $J$  pequeña ( $\delta_{\text{H}}$  6.87) que integra por un protón.



**Figura 181.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **12**.

Finalmente, la presencia de la señal de un grupo carbonilo a 189.1 ppm en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **12**, sugirió que su estructura se podría corresponder a la *p*-quinona de la halioxepina (**10**). La estereoquímica relativa de los estereoclusters **A** y **B** de ambas estructuras resultó ser idéntica, pero el valor de rotación óptica de **12**  $[\alpha]_{\text{D}} = -23$  de signo opuesto a **10**  $[\alpha]_{\text{D}} = +14$ , indicó una clara diferencia entre la configuración relativa de ambos fragmentos. Para comprobar que el cambio de signo de rotación óptica entre **10** y **12** es debido a la diferente estereoquímica relativa, se buscó en la bibliografía pares de compuestos quinona-hidroquinona, encontrándose que los casos de arenol-arenone,<sup>129</sup> cacospongin B-cacospongin C,<sup>130</sup> avarol-avarone, neoavarol-neoavarone,<sup>131</sup> zonarol-zonarone, isozonarol-isozonarone,<sup>132</sup> siempre conservan el mismo signo de sus rotaciones ópticas.



Halioxepina C (**12**)

Figura 182. Estructura plana de halioxepina C (**12**).

<sup>129</sup> F. J. Schmitz, V. Lakshmi, D. R. Powell, D. Van der Helm, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 241-244.

<sup>130</sup> D. Tasdemir, G. P. Concepción, G. C. Mangalindan, M. K. Harper, E. Hajdu, C. M. Ireland, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9025-9030.

<sup>131</sup> K. Iguchi, A. Sahashi, Y. Yamada, J. Kohno, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). **1990**, 38, 1121-1123.

<sup>132</sup> T. Laube, J. Schröder, R. Stehle, K. Seifert, *Tetrahedron* **2002**, 58, 4299-4309.

#### 6.2.4. Determinación de la estereoquímica relativa de la halioxepina y halioxepina B, y estereoquímica absoluta de la halioxepina C.

Dado que utilizando exclusivamente métodos experimentales no se pudo determinar la estereoquímica relativa entre los estereoclusters **A** y **B**, se recurrió a la utilización de cálculos computacionales basados en DFT.

##### 6.2.4.1. Esterequímica relativa de Halioxepine B

El primer paso consistió en la búsqueda conformacional de los dos posibles isómeros del compuesto **11** que surgen de las dos posibilidades de conexión de los estereoclusters **A** y **B**, a los que llamaremos **11(7R\*10R\*)** y **11(7R\*10S\*)**, y que se muestran en la Figura 183.

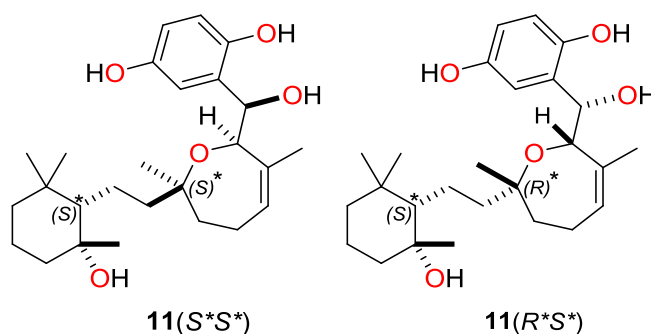


Figura 183. Posibles isómeros para el compuesto **11**.

Para cada uno de los diastereoisómeros se calcularon todos los confórmeros en una ventana de 3 kcal/mol, obteniéndose 12 confórmeros para el isómero **11(S\*S\*)** y 9 para el isómero **11(R\*S\*)**. Cada uno de los confórmeros se minimizaron por DFT, calculando a su vez la frecuencia de vibración usando el funcional B3LYP y como conjunto base 6-31G(d). Para cada uno de los grupos de confórmeros se calculó su distribución de Boltzmann, basándose en las energías, para conocer su aportación al valor teórico de la propiedad física que se iba a calcular, en este caso, los desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  y de  $^1\text{H}$ .

A partir de los confórmeros minimizados, se obtuvo el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para cada uno de ellos, usando el método GIAO (gauge independent atomic orbital) en cloroformo. Como funcional se utilizó el MPW1PW91 y como conjunto base 6-311++G(2d,p). Posteriormente, se ponderaron los desplazamientos químicos de los diferentes confórmeros en función de la distribución de Boltzmann, para obtener un desplazamiento promedio para cada valor de  $^{13}\text{C}$ .

**Tabla 22.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  experimentales y teóricos en ppm del compuesto **11**.

S*S*	R*S*	EXP
79.98	80.46	<b>74.3</b>
60.94	58.70	<b>55.7</b>
39.77	39.10	<b>36.0</b>
35.42	36.76	<b>43.2</b>
22.71	22.12	<b>19.5</b>
36.78	37.11	<b>42.0</b>
22.39	22.43	<b>21.1</b>
48.74	47.06	<b>44.8</b>
79.14	79.81	<b>78.0</b>
40.39	46.44	<b>40.0</b>
26.34	25.54	<b>24.4</b>
130.69	132.25	<b>129.6</b>
145.63	146.42	<b>138.7</b>
81.78	77.74	<b>75.4</b>
71.68	71.48	<b>72.0</b>
133.55	133.01	<b>131.3</b>
147.87	147.66	<b>150.8</b>
113.21	113.39	<b>116.4</b>
115.36	115.00	<b>114.8</b>
155.39	155.40	<b>148.2</b>
118.11	118.28	<b>116.3</b>
30.53	30.26	<b>22.0</b>
29.05	29.88	<b>32.5</b>
30.37	30.99	<b>31.6</b>
26.01	19.87	<b>21.3</b>
21.22	21.94	<b>21.2</b>

Se parametrizaron los valores teóricos obtenidos, y se ajustaron mediante regresión lineal ambos isómeros, obteniendo un mejor ajuste en el isómero  $R^*S^*$  que en el isómero  $S^*S^*$ , como se muestra en la Figura 184.

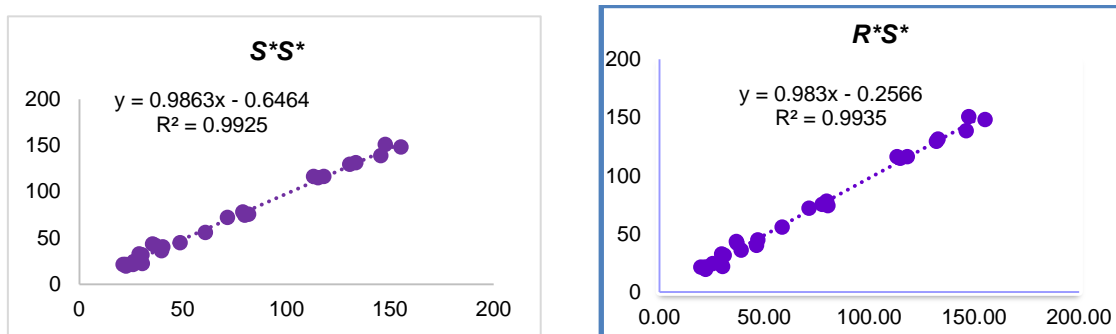


Figura 184. Ajuste por regresión lineal de los desplazamientos teóricos para el compuesto 11.

Por último, los valores de los desplazamientos químicos teóricos, una vez escalados según su pendiente y ordenada en el origen, se enfrentaron a los experimentales mediante la aplicación diseñada por Goodman<sup>133</sup> para calcular la probabilidad DP4. En esta ocasión, el isómero  $R^*S^*$  se nombró como isómero 1 y el  $S^*S^*$  como isómero 2. Como se puede observar en la Figura 185, existe una probabilidad del 99.8% utilizando este parámetro con el diastereoisómero  $R^*S^*$ .

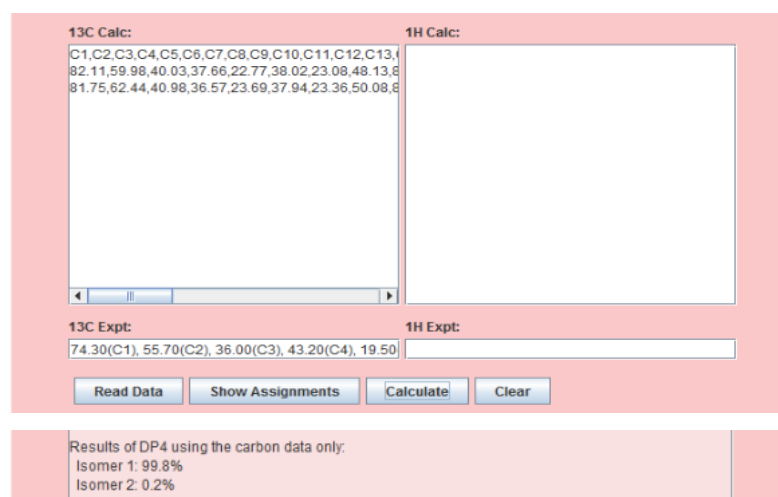


Figura 185. Probabilidad DP4 de los isómeros estudiados para el compuesto 11.

<sup>133</sup>

Smith, S.G.; Goodman, J.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946-12959. <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>

Utilizando el nuevo parámetro DP4+ descrito por Sarotti,<sup>134</sup> se introdujeron los desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en la hoja Excel diseñada por los autores, obteniéndose de nuevo el isómero **1** con un 100% de probabilidad. Por consiguiente, se estableció que la estereoquímica relativa del compuesto **11** es  $1S^*,2S^*,7R^*,10S^*,11R^*$ .

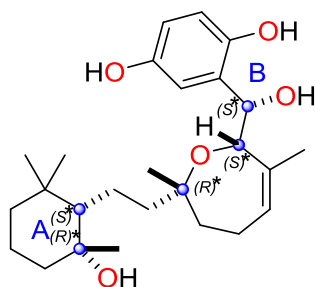


Figura 186. Estereoquímica relativa del compuesto **11**.

#### 6.2.4.2. Estereoquímica relativa de Halioxepine (**10**)

Con el compuesto **10** se siguió un proceso similar para determinar la relación entre sus dos estereoclusters. Mediante estudios por RMN, su estereoquímica relativa fue propuesta como  $1S^*,2S^*,7R^*,10S^*,15S^*$  **10(7R\*10S\*)** o  $1S^*,2S^*,7R^*,10R^*,15R^*$  **10(7R\*10R\*)**. Ambos diastereoisómeros fueron procesados mediante estudios computacionales utilizando el software Maestro, obteniendo 18 conformeros para el isómero **10(7R\*10S\*)** y 13 para el **10(7R\*10R\*)**. Después de los cálculos teóricos de sus desplazamientos químicos usando niveles de energía B3LYP/6-31G(d)//GIAO///MPW1PW91/6-311++G (2d,p), se aplicó una aproximación de probabilidad DP4. Se encontró que el isómero **10(7R\*10R\*)** obtenía una probabilidad del 99.8% comparando solo desplazamientos de protón, mientras que, comparando solo datos de carbono, el isómero **10(7R\*10S\*)** fue el que más se ajustaba con un 84.1%.

<sup>134</sup> N. Grimblat, M. M. Zanardi and A. M. Sarotti, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 12526–12534.

Finalmente, al comparar desplazamientos tanto de protón como de carbono simultáneamente, el isómero **10(7R\*10R\*)** se obtenía una probabilidad del 98.7% (Figura 187). Utilizando el parámetro DP4+ de Sarotti, la probabilidad es del 100% de que el compuesto tenga una estereoquímica relativa para **10** como 1S\*,2S\*,7R\*,10R\*,15R\*.

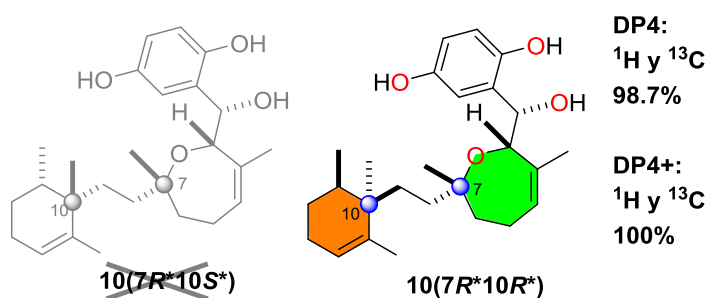
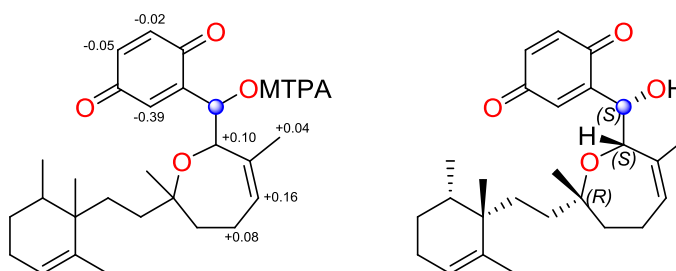


Figura 187. Estudios DFT y probabilidad estadística DP4 encontrada para **10**.

#### 6.2.4.3. Estereoquímica absoluta de Halioxepine C (11)

De nuevo, la configuración relativa completa de **11** se estableció mediante métodos computacionales, los cuales permitieron conectar ambos estereoclusters. El análisis conformacional de los dos posibles diastereoisómeros de **11** 1S\*,2S\*,7R\*,10S\*,15S\* y 1S\*,2S\*,7R\*,10R\*,15R\*, seguido de cálculos DFT-RMN (energía//RMN B3LYP/6-31G(d)//GIAO MPW1PW91/6-311++G(2d,p)), usando la aproximación de probabilidad DP4, se aplicaron a **11**. Como resultado, la combinación de estereoclusters 1S\*,2S\*,7R\*,10S\*,15S\* mostró el mejor ajuste DP4+ (100% para <sup>1</sup>H, 70% para <sup>13</sup>C y 100% para ambos). De este modo, los valores opuestos de rotación óptica entre la quinona y la dihidroquinona pueden explicarse debido a la diferencia de la estereoquímica relativa entre los dos estereoclusters.

Finalmente, la configuración absoluta del OH en C1 en el compuesto **12** se determinó mediante la aplicación del método de Mosher, con la consiguiente formación de los ésteres del ácido metoxifenil acético (MTPA). Las diferencias en los desplazamientos químicos de los protones adyacentes de ambos ésteres entorno a C1 (Figura 188) permitieron determinar cómo *S* su configuración absoluta.



**Figura 188.** Análisis de los ésteres de MTPA de **12** y la configuración absoluta en C1, C2 y C7 resultante.

Por lo tanto, se propone la configuración absoluta *1S,2S,7R,10S,15S* para el compuesto **12**.



Una vez conocidas sus estructuras, se realizó su estudio como posibles compuestos citotóxicos. Los resultados mostraron una moderada actividad citotóxica, dando valores de  $GI_{50}$  6.7  $\mu$ M para pulmón (A-549), 8.8  $\mu$ M para colon (HT-29), 7.6  $\mu$ M para mama (MDA-MB-231), y de 8.3  $\mu$ M para páncreas (PSN-1) en el compuesto **11**, y  $GI_{50}$  11  $\mu$ M para pulmón (A-549), 12  $\mu$ M para colon (HT-29), 11  $\mu$ M para mama (MDA-MB-231), y de 12  $\mu$ M para páncreas (PSN-1) para el compuesto **12**. Estos valores juntos con los de TGI y  $LC_{50}$  se recogen en la Tabla 23 y Tabla 24.

**Tabla 23.** Actividad citotóxica del compuesto **11**.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	6.7 $\mu$ M	9.9 $\mu$ M	15 $\mu$ M
HT-29	8.8 $\mu$ M	9.2 $\mu$ M	>23 $\mu$ M
MDA-MB-231	7.6 $\mu$ M	11 $\mu$ M	18 $\mu$ M
PSN-1	8.3 $\mu$ M	8.8 $\mu$ M	9.5 $\mu$ M

**Tabla 24.** Actividad citotóxica del compuesto **12**.

Línea celular	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
A549	11 $\mu$ M	>24 $\mu$ M	>24 $\mu$ M
HT-29	12 $\mu$ M	>24 $\mu$ M	>24 $\mu$ M
MDA-MB-231	11 $\mu$ M	>24 $\mu$ M	>24 $\mu$ M
PSN-1	12 $\mu$ M	15 $\mu$ M	20 $\mu$ M

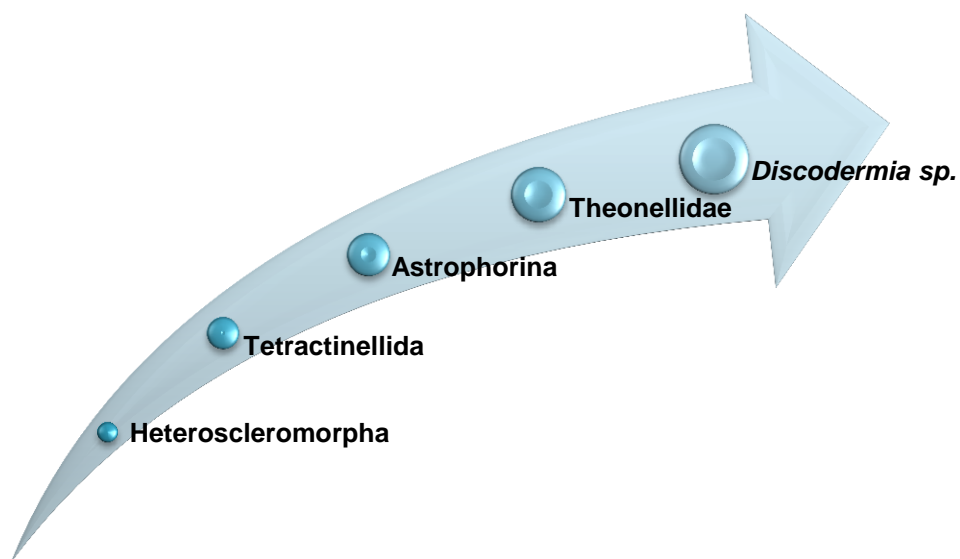
Finalmente, la familia de halioxepinas son meroditerpenos, por lo que su biogénesis se basa en el isopreno como precursor biológico.



*CAPÍTULO VII*  
*DISCODERMIA SP.*

## 7. ESTUDIO DE LA ESPONJA DISCODERMIA SP.

La esponja del género *Discodermia*, pertenece al suborden Astrophorina orden Tetractinellida, subclase Heteroscleromorpha, clase Demospongiae (Esquema 14). Destaca por su crecimiento polimórfico masivo irregular, con forma de copa, ramificada o cilíndrica.<sup>135</sup>



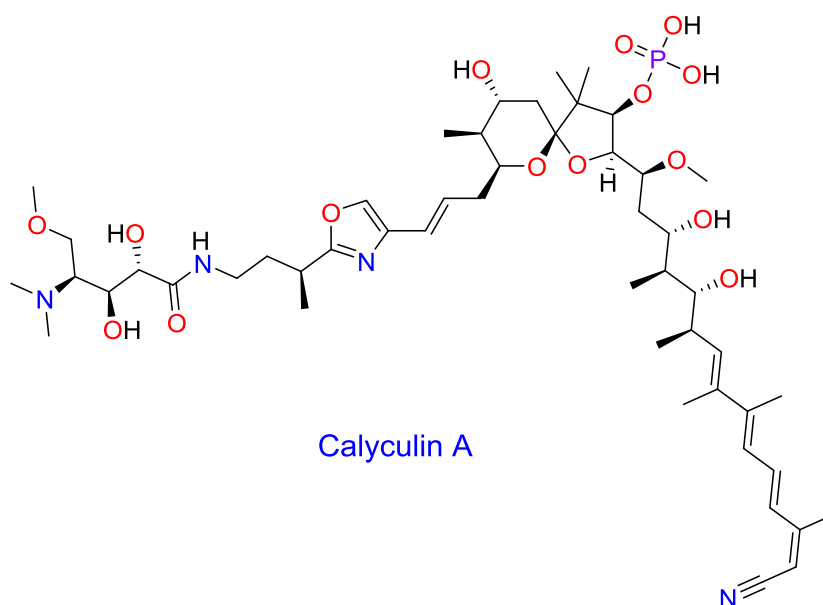
**Esquema 14.** Clasificación de las esponjas del género *Discodermia*.

---

<sup>135</sup> *Systema Porifera*; Hooper, J. N. A.; Van Soest, R. W. M.; Willenz, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002.

### 7.1. Compuestos más significativos aislados del genero *Discodermia*

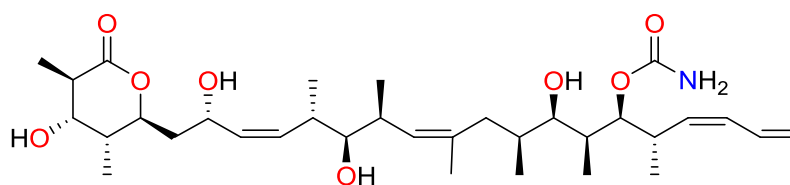
El estudio de las esponjas del género *Discodermia* ha traído consigo el aislamiento de unos 60 metabolitos secundarios. Aunque destacan los ciclopéptidos citotóxicos, como las calyxamidas o la ciclolithistida, uno de los más estudiados es el compuesto citotóxico calyculin A (Figura 189), cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva de las proteínas fosfatasas.<sup>136</sup>



**Figura 189.** Estructura del compuesto calyculin A.

<sup>136</sup> Suganuma, M.; Fujiki, H.; Furuya-Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Yasumoto, S.; Kato, Y.; Fusetani, N.; Sugimura, T. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3521–3525.

El primer compuesto aislado de una esponja del género *Discodermia* fue discodermolido (ver Figura 190) en 1987. La necesidad de grandes cantidades del metabolito para estudios preclínicos, llevaron a la recolección de 20 kg *Discodermia* en 1998. Este compuesto mostró una gran actividad inmunosupresora y antiproliferativa, iniciándose estudios en fase I con el fin de desarrollar el fármaco como tratamiento antitumoral. Desafortunadamente en 2004 se suspendió los estudios clínicos por su elevada toxicidad.<sup>137</sup>



Discodermolido

Figura 190. Estructura del compuesto discodermolido.

---

<sup>137</sup> Cragg, G. M.; Kingston D. G. I.; Newman, D. J. Anticancer Agents from Natural Products, 2011.

## 7.2. Discodermia sp.

### 7.2.1. Identificación y clasificación

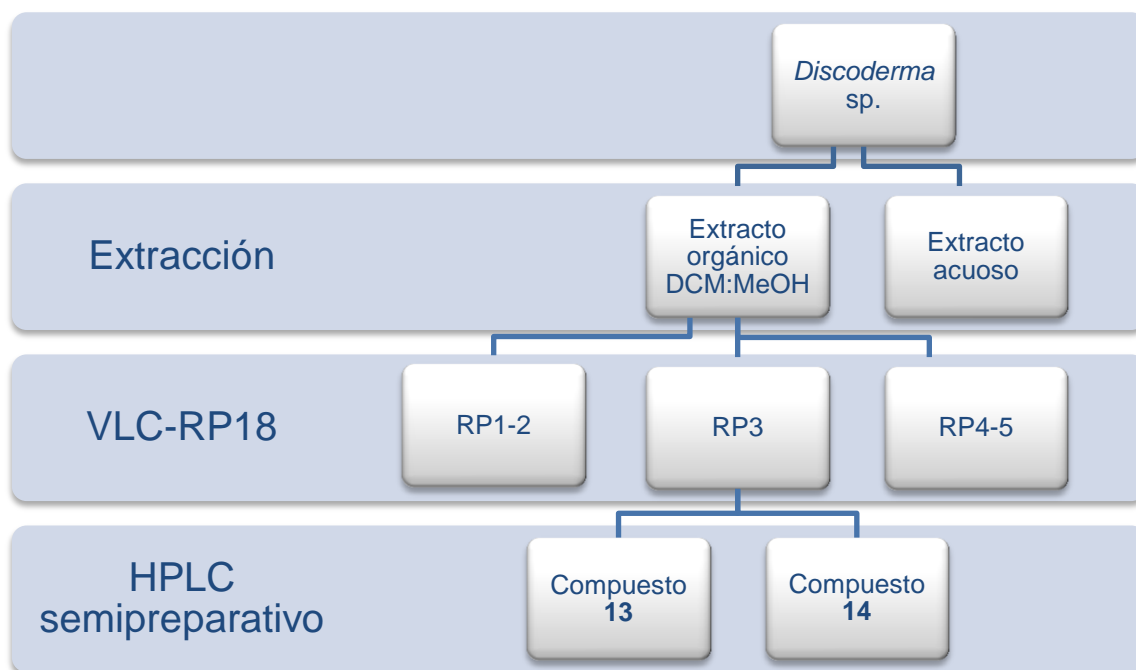


**Figura 191.** Fotografía de la esponja *Discodermia* sp.

La esponja *Discodermia* sp. fue recogida durante el mes de abril de 2014, en la expedición científica realizada por el departamento de expediciones de PharmaMar en Haruku, Indonesia, cerca de Pulau Gunung (129°51.952'E 04°31.584'S) mediante el uso del sistema de buceo rebreather en profundidad. Se clasificó taxonómicamente por la Dra. Maria Jesús Uriz Lespe del Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. La muestra se codificó como ORMA131384, y se estudiaron 222 g de los 242 g recogidos.

## 7.2.2. Extracción y fraccionamiento

La muestra se troceó para facilitar la realización de dos extracciones sólido-líquido, una con una mezcla 1:1 de metanol:diclorometano, y otra posterior con agua. El extracto orgánico se fraccionó a través de una placa filtrante con gel de sílice de fase invertida, eluyéndose con agua, metanol, diclorometano y mezclas de estos disolventes, en orden decreciente de polaridad. La fracción metanólica (477 mg) se fraccionó mediante HPLC semipreparativo, obteniéndose aurantoside E<sup>138</sup> **13** (23.9 mg) y el nuevo compuesto **14** (14.0 mg). El proceso viene recogido en el Esquema 15.



Esquema 15. Fraccionamiento de la esponja *Discodermia* sp.

El proceso de fraccionamiento se controló mediante estudio de su actividad citotóxica y espectrometría de masas de baja resolución.

<sup>138</sup> Sata, N. U.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 969–971.



### 7.2.3. Determinación estructural

#### 7.2.3.1. Aurantoside E (13)

El compuesto **13** se obtuvo como un sólido amorfo rojizo. Mediante el estudio de espectrometría de masas en alta resolución se observó el ión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  843.2608, correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{38}H_{49}^{35}Cl_2N_2O_{15}$  (calc. para  $C_{38}H_{49}^{35}Cl_2N_2O_{15}$   $m/z$  843.2505  $\Delta m = 0.0103$  uma), con una distribución isotópica 3:2:1 con  $m/z$  843, 845 y 847 característico para una molécula con dos átomos de cloro. El espectro de masas de baja resolución (Figura 192) mostró los iones  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  y  $[2M+Na]^+$  a  $m/z$  843, 865 y 1707.

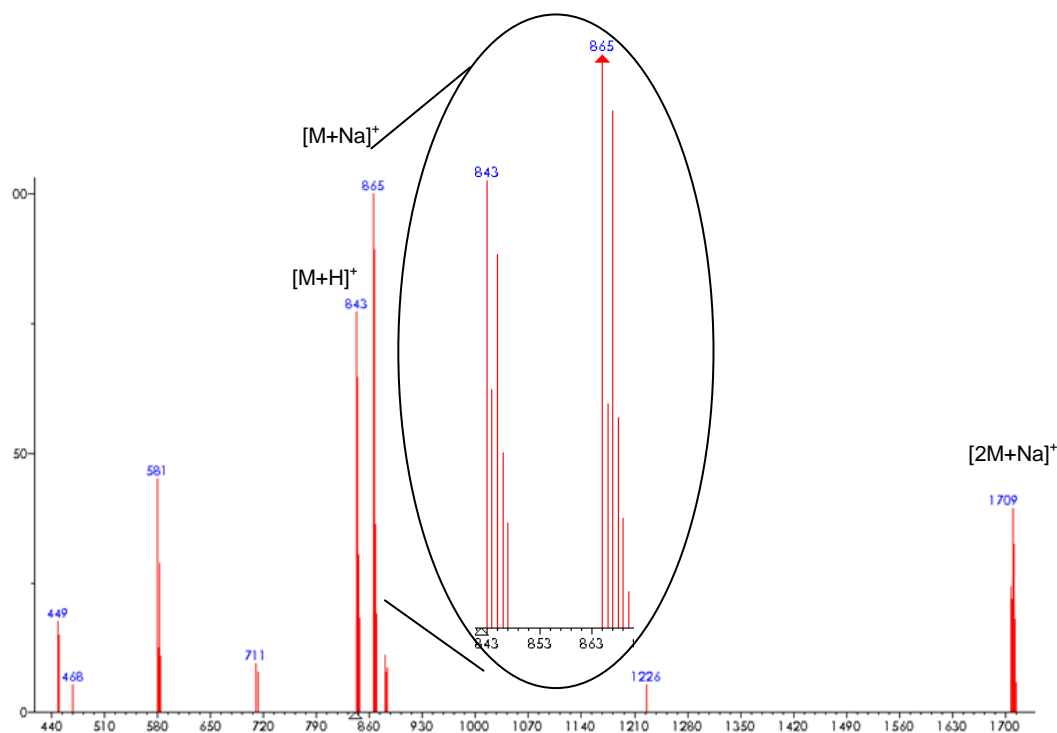
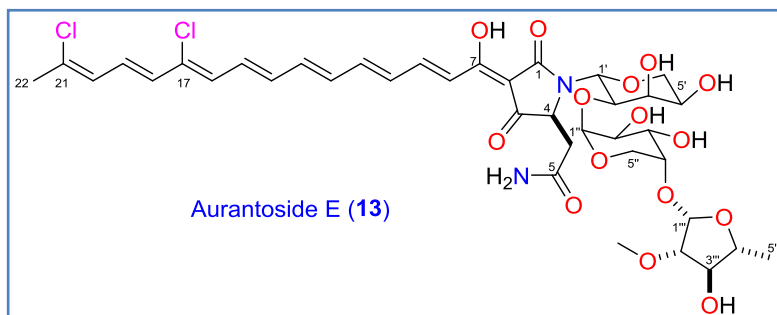


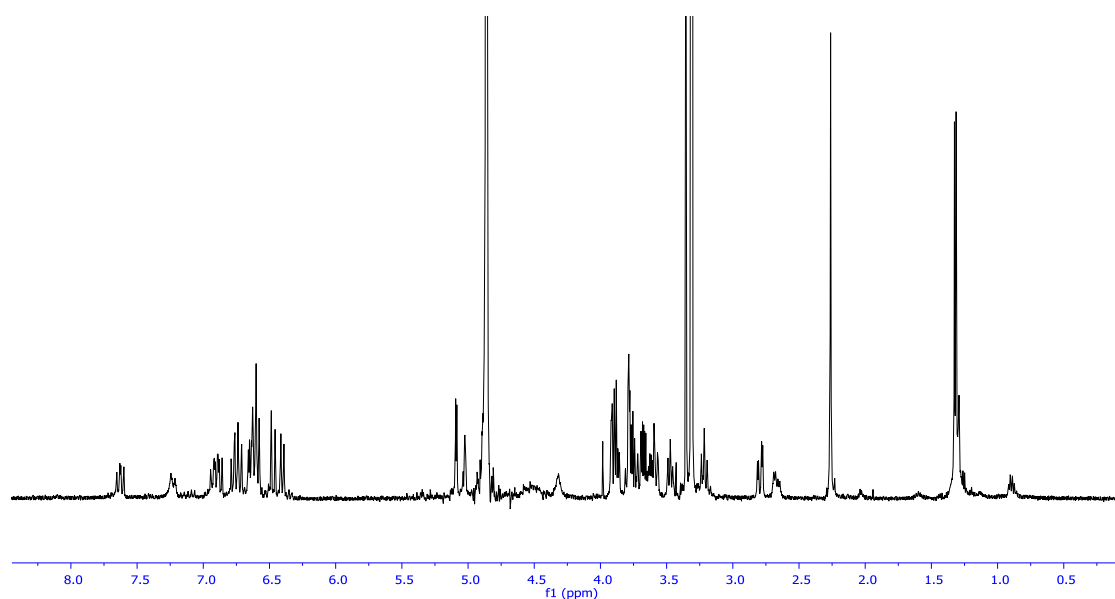
Figura 192. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **13**.

Con la fórmula molecular, se realizó una búsqueda bibliográfica en MarinLit, encontrándose una sola coincidencia que resultó ser el compuesto aurantoside E.<sup>139</sup> Se realizó una RMN de  $^1H$  (Figura 193) para confirmar que se trataba del mismo compuesto (Tabla 25).

<sup>139</sup> Sata, N. U.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 969–971.

**Tabla 25.** Comparativa de los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) del compuesto **13** con publicados para aurantoside E en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Pos.	$\delta_{\text{H}}$ , bibliograficos	$\delta_{\text{H}}$ , compuesto <b>13</b>
1		
2		
3		
4	4.30 br s	4.32 br s
5 $\alpha$	2.66 br	2.67 dd (7.1, 16.1)
$\beta$	2.78 dd (3.6, 16.2)	2.79 dd (4.1, 16.1)
6		
7		
8	7.24 d (14.4)	7.23 d (15.4)
9	7.59 dd (11.2, 14.4)	7.63 dd (11.5, 15.4)
10	6.62 m	6.62 m
11	6.89 m	6.90 m
12	6.57 m	6.47 d (14.3)
13	6.70 dd (11.9, 14.6)	6.75 m
14	6.59 m	-
15	6.87 dd (11.9, 14.2)	-
16	6.56 m	-
17		
18	6.48 d (14.6)	-
19	6.93 dd (10.6, 14.6)	-
20	6.33 d (10.6)	6.40 d (11.5)
21		
22	2.22 br s	2.26 s
1'	4.50 br s	-
2'	3.63 m	3.63 m
3'	3.48 t (8.9)	3.47 t (9.1)
4'	3.62 m	-
5' $\alpha$	3.20 t (11.3)	3.22 t (10.9)
$\beta$	3.86 dd (6.0, 11.3)	3.89 m
1''	5.02 br s	5.02 s
2''	3.79 dd (2.3, 10.6)	3.78 dd (2.9, 4.7)
3''	3.75 m	3.76 m
4''	3.90 dd (3.0, 4.2)	-
5'' $\alpha$	3.58 dd (3.0, 12.4)	3.58 dd (3.0, 12.8)
$\beta$	3.70 br d (12.4)	3.71 br d (12.8)
1'''	5.08 d (4.2)	5.09 d (4.4)
2'''	3.68 dd (4.2, 8.1)	3.67 dd (4.4, 8.1)
3'''	3.89 m	-
4'''	3.74 m	-
5'''	1.32 d (6.2)	1.32 d (6.3)
$\text{OCH}_3$	3.34 s	3.35 s



**Figura 193.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **13**.

El estudio de su actividad citotóxica frente a un panel de 4 líneas celulares donde los resultados mostró una significativa actividad citotóxica, dando valores de  $\text{GI}_{50}$  1.7  $\mu\text{M}$  para pulmón (A-549), 1.7  $\mu\text{M}$  para colon (HT-29), 2.0  $\mu\text{M}$  para mama (MDA-MB-231), y de 1.1  $\mu\text{M}$  para páncreas (PSN-1). Los valores se recogen en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Actividad citotóxica del compuesto **13**.

Línea celular	$\text{GI}_{50}$	TGI	$\text{LC}_{50}$
A549	1.7 $\mu\text{M}$	2.4 $\mu\text{M}$	3.4 $\mu\text{M}$
HT-29	1.7 $\mu\text{M}$	2.1 $\mu\text{M}$	3.0 $\mu\text{M}$
MDA-MB-231	2.0 $\mu\text{M}$	2.7 $\mu\text{M}$	3.8 $\mu\text{M}$
PSN-1	1.1 $\mu\text{M}$	1.9 $\mu\text{M}$	3.1 $\mu\text{M}$

7.2.3.2. *Gunungamida A (14)*

El espectro de masas de alta resolución del compuesto **14** mostró el ión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  672.1518, correspondiente a la fórmula molecular  $C_{25}H_{30}^{35}ClN_7O_{11}S$  (calc. para  $C_{25}H_{30}^{35}ClN_7O_{11}S$   $m/z$  672.1485  $\Delta m = 0.0033$  uma) como se observa en la Figura 194. La distribución isotópica 3:1 a  $m/z$  672 y 674, confirma la presencia de un átomo de cloro.

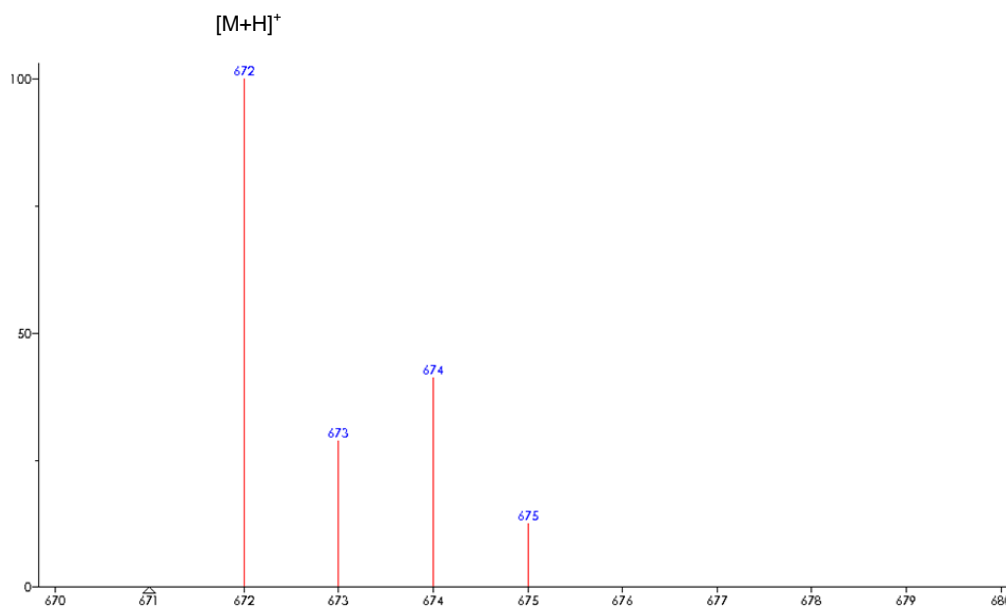


Figura 194. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **14**.

La estructura de **14** se determinó a través de la realización de experimentos mono y bidimensionales de RMN.

El análisis de los experimentos de RMN en CD<sub>3</sub>OD de <sup>1</sup>H (Figura 195), <sup>13</sup>C (Figura 196) y HSQC-editado (Figura 197), indicó que el compuesto **14** contiene once carbonos cuaternarios  $sp^2$  ( $\delta_C$  175.0, 173.8, 173.4, 172.9, 171.1, 170.5, 162.7, 161.7, 150.0, 121.2 y 115.5), tres metinos  $sp^2$  ( $\delta_H$  8.19 /  $\delta_C$  126.3, 6.98/ 123.2 y 6.26 /111.6), tres metilenos  $sp^3$  ( $\delta_H$  4.25;3.63 /  $\delta_C$  41.9, 3.91/61.8 y 3.05/36.6), seis metinos  $sp^3$  ( $\delta_H$  6.02 /  $\delta_C$  72.6, 5.77/55.0, 4.83/51.1, 4.44/67.3, 4.25/60.6 y 4.07/59.5), y dos metilos ( $\delta_H$  1.42 /  $\delta_C$  17.4 y 1.20/20.4). El número elevado de carbonos con desplazamiento químico cercano a 170 ppm y de metinos unidos a heteroátomos, sugirió que el compuesto **14** debe tener naturaleza peptídica. Todos los desplazamientos químicos se recogen en la Tabla 27.

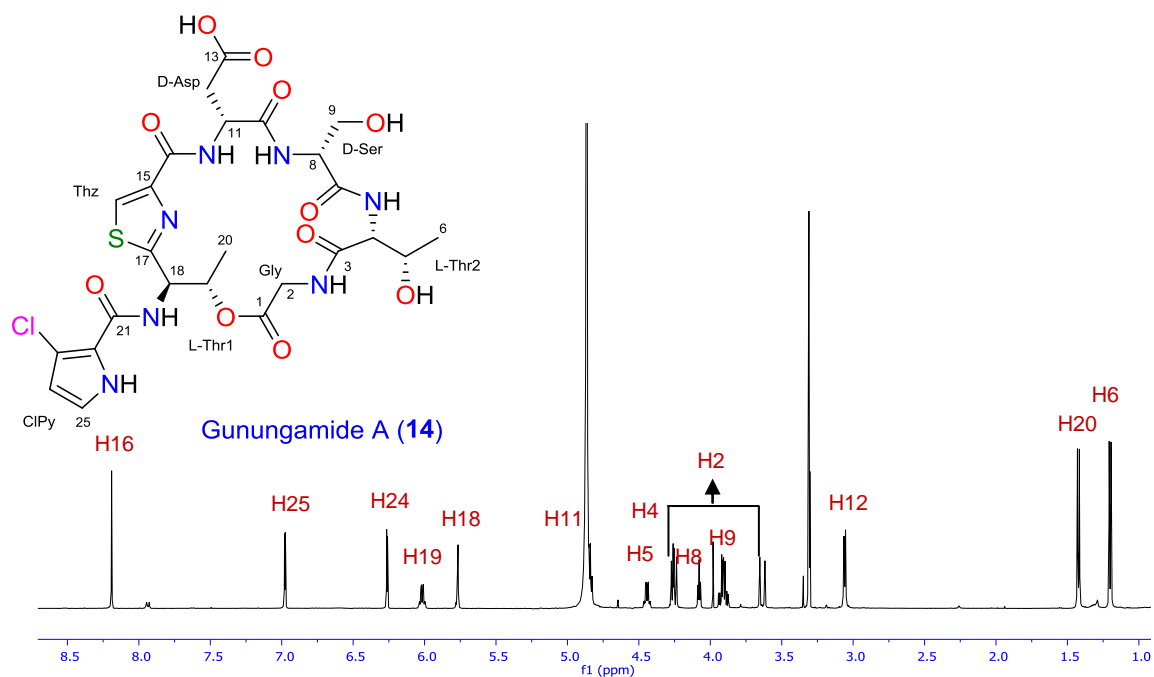


Figura 195. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 14.

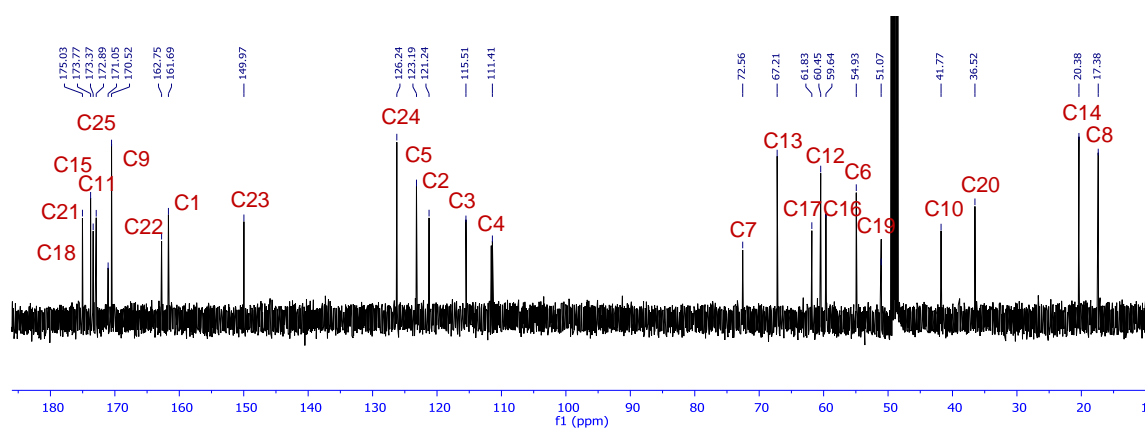


Figura 196. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 14.

Tabla 27. Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del compuesto 14 ( $\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$  y  $\text{DMSO}-d_6^{\text{b}}$ ).

a	b
---	---

	Pos.	$\delta_C$ , mult	$\delta_H$ , mult (J in Hz) <sup>a</sup>	$\delta_C$ , mult	$\delta_H$ , mult (J in Hz) <sup>b</sup>
<b>Gly</b>	1	170.5, C		168.7, C	
	2	41.9, CH <sub>2</sub>	4.25, d (18.0) 3.63, d (18.0)	40.4, CH <sub>2</sub>	4.11, dd (17.9, 7.7) 3.49, dd (17.9, 4.2)
	NH				7.60, dd (7.6, 4.4)
<b>Thr2</b>	3	172.9, C		170.2, C	
	4	60.6, CH	4.25, d (2.5)	58.5, CH	4.03, dd (8.3, 2.9)
	5	67.3, CH	4.44, dd (6.5, 2.9)	65.0, CH	4.21, m
	6	20.4, CH <sub>3</sub>	1.20, d (6.20)	20.3, CH <sub>3</sub>	1.04, d (6.4)
	NH				7.43, d (8.2)
<b>Ser</b>	7	173.4, C		170.3, C	
	8	59.5, CH	4.07, dd (4.7, 4.7)	58.1, CH	3.92, m
	9	61.8, CH <sub>2</sub>	3.91, dd (7.2, 4.7)	60.4, CH <sub>2</sub>	3.73, dd (11.0, 4.7) 3.66, dd (11.0, 5.9)
	NH				8.77, d (5.0)
<b>Asp</b>	10	175.0, C		172.0, C	
	11	51.1, CH	4.83, m	49.4, CH	4.59, ddd (8.9, 7.8, 2.6)
	12	36.6, CH <sub>2</sub>	3.05, d (5.5)	35.3, CH <sub>2</sub>	2.96, dd (16.0, 2.6) 2.83, dd (16.2, 9.0)
	13	173.8, C		172.4, C	
	NH				8.21, d (7.8)
<b>Tzl</b>	14	162.7, C		159.9, C	
	15	150.0, C		148.5, C	
	16	126.3, CH	8.19, s	125.0, CH	8.23, s
	17	171.1, C		168.5, C	
<b>Thr1</b>	18	55.0, CH	5.77, d (1.8)	53.0, CH	5.75, m
	19	72.6, CH	6.02, dd (6.6, 1.8)	70.4, CH	5.78, m
	20	17.4, CH <sub>3</sub>	1.42, d (6.6)	16.8, CH <sub>3</sub>	1.31, d (6.4)
<b>CIPy</b>	21	161.7, C		159.3, C	
	22	121.2, C		120.0, C	
	23	115.5, C		113.3, C	
	24	111.6, CH	6.26, d (2.8)	110.2, CH	6.28, dd (2.7)
	25	123.2, CH	6.98, d (2.8)	122.0, CH	7.02, dd (3.1)
	NH				12.05, dd (3.0)

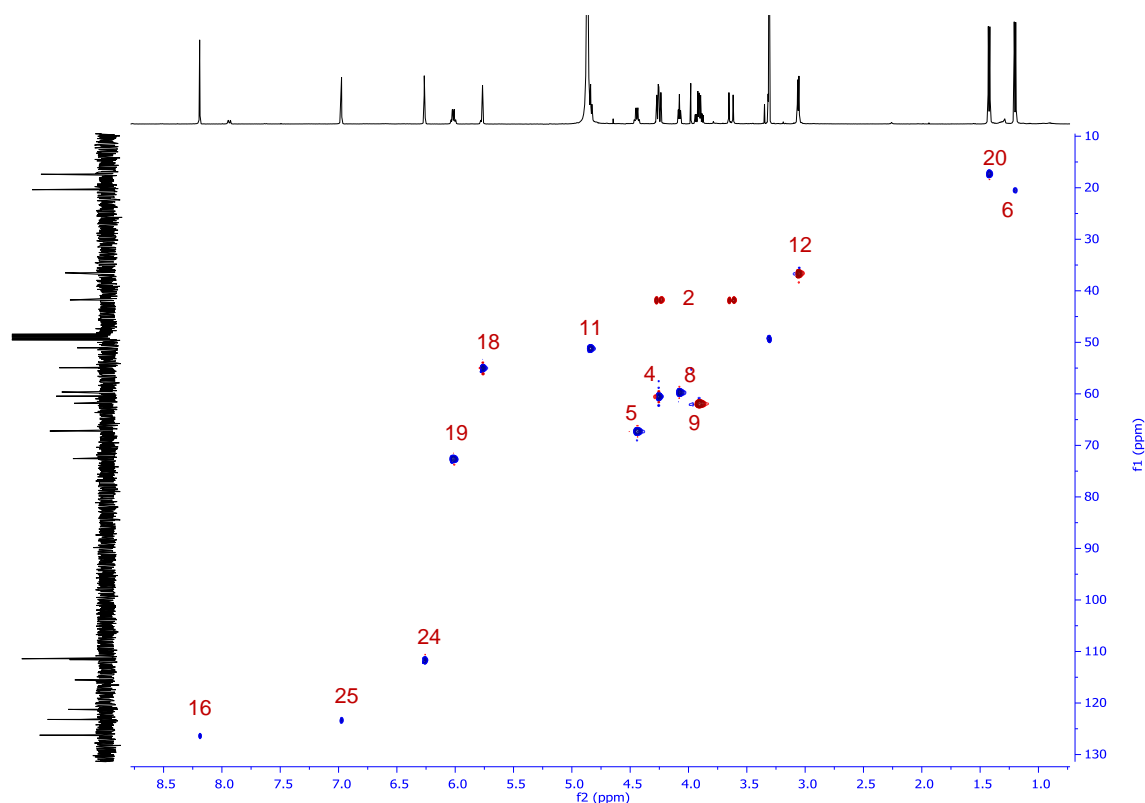


Figura 197. Espectro gHSQC (CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 14.

Mediante la realización del experimento de RMN mono y bidimensional 1D-TOCSY (Figura 199) y <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figura 200), se detectaron 7 sistemas de espín diferentes (Figura 198). Con la ayuda de los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se identificaron dos treoninas (Thr1  $\delta_H$  5.77, 6.02 y 1.42 y Thr2  $\delta_H$  4.25, 4.44 y 1.20), una glicina ( $\delta_H$  4.25 y 3.63), una serina ( $\delta_H$  4.07 y 3.91) y un ácido aspártico ( $\delta_H$  4.83 y 3.05). Por último, los otros dos restantes sistemas espín estaban formados por las señales  $\delta_H$  6.26 y 6.98, por un lado y  $\delta_H$  8.19 por otro.



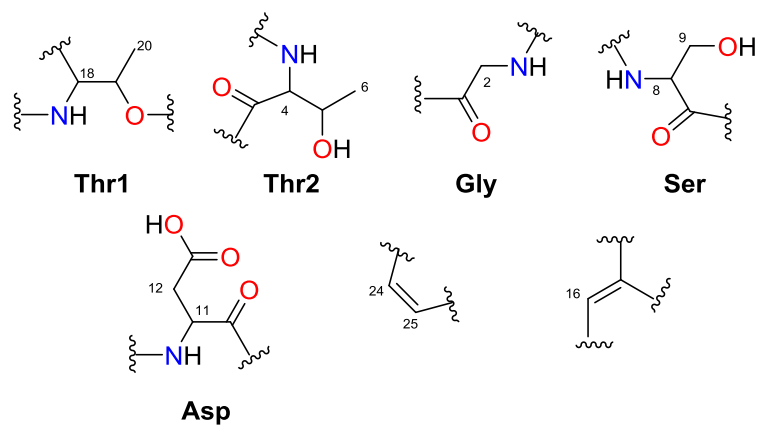
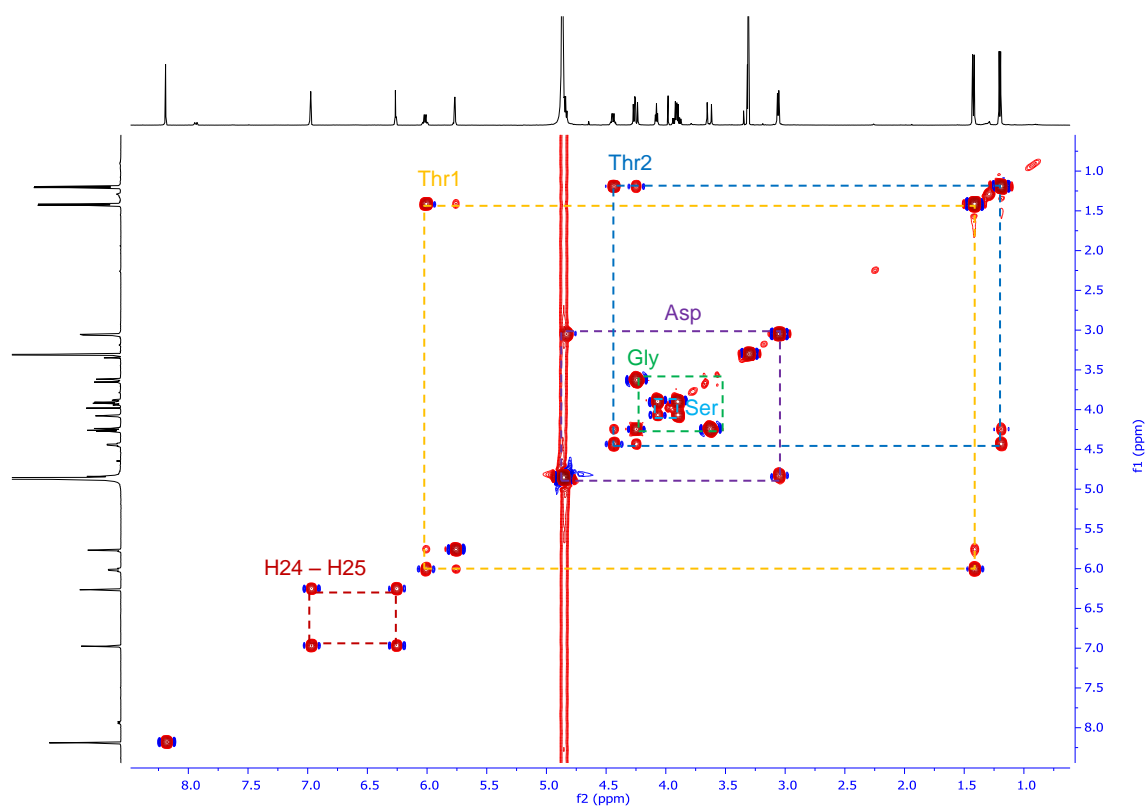


Figura 198. Sistemas de espín del compuesto 14.

Figura 199. Espectro TOCSY (CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 14.

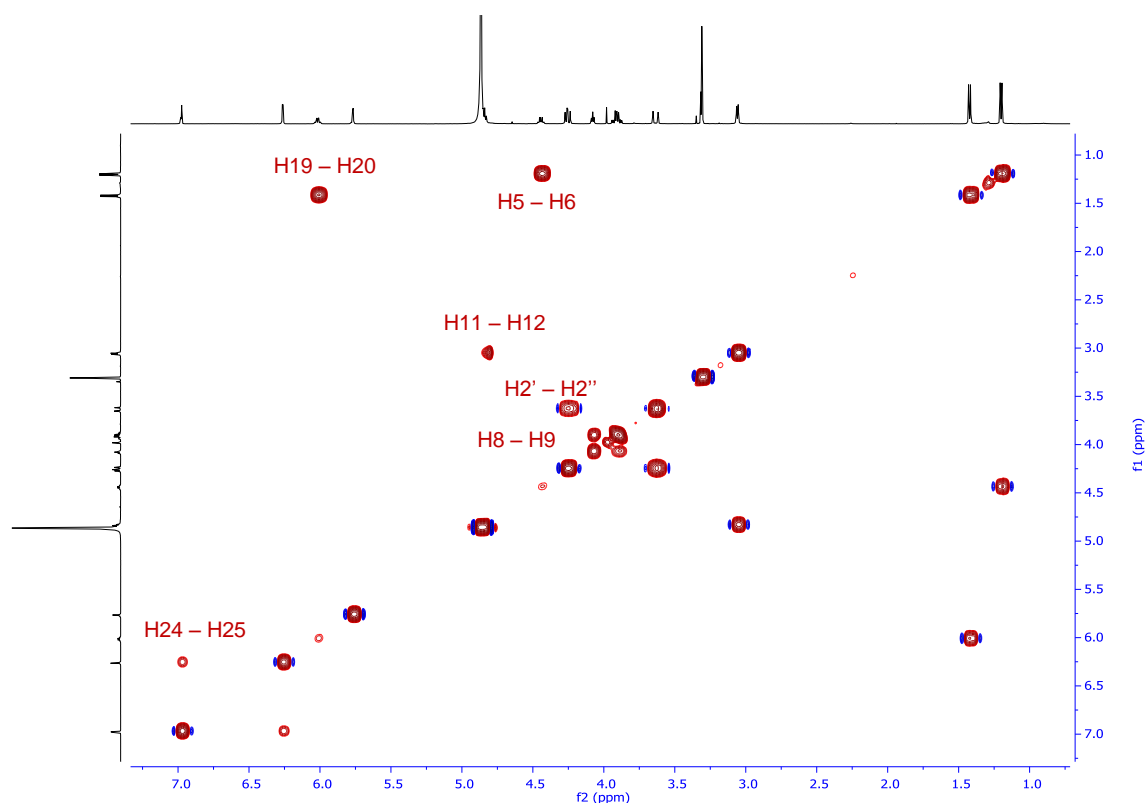
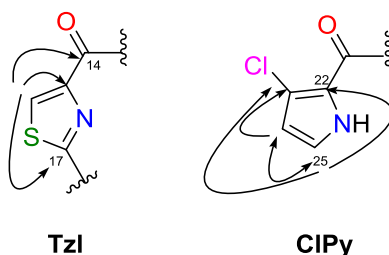


Figura 200. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **14**.

Para deducir las estructuras de los fragmentos correspondientes a los dos restantes sistemas de espín que quedaban por resolver, se recurrió al experimento de RMN a larga distancia HMBC (Figura 203). Por un lado, el desplazamiento químico de protón **H16** como un singlete a  $\delta_{\text{H}}$  8.19, conjuntamente con las correlaciones HMBC que muestra con los carbonos cuaternarios C14 ( $\delta_{\text{C}}$  162.7), C15 ( $\delta_{\text{C}}$  150.0) y C17 ( $\delta_{\text{C}}$  171.1), indicó que se trataba de un anillo de tiazol unido a un carbonilo.

Por otro lado, los desplazamientos químicos de protones **H24** a  $\delta_{\text{H}}$  6.26 y **H25** a  $\delta_{\text{H}}$  6.98, su acoplamiento entre sí con una  $J$  pequeña (2.8 Hz) y sus correlaciones a larga distancia con los carbonos C23 ( $\delta_{\text{C}}$  115.5), y C22 ( $\delta_{\text{C}}$  121.2) sugirieron que se trataba de un pirrol disustituido.

El desplazamiento a campo bajo de **H24** a  $\delta_{\text{H}}$  6.26 y del C23 a  $\delta_{\text{C}}$  115.5, junto con la presencia de un cloro tal como indica el espectro de masas de alta resolución en el compuesto **14**, sugirió que el anillo de pirrol disustituido contenía un átomo de cloro en la posición 23.



**Figura 201.** Correlaciones HMBC observadas en los anillos de tiazol y cloro-pirrol del compuesto **14**.

La secuencia de aminoácidos en el compuesto **14** se determinó mediante el experimento de HMBC, en donde se observaron las correlaciones a larga distancia de los protones en posición  $\alpha$  del aminoácido con los carbonilos amídicos adyacentes. Así se observaron correlaciones entre **H11** ( $\delta_H$  4.83) del ácido aspártico con el carbono C14 ( $\delta_C$  162.7) del tiazol, que a su vez correlacionaba con otros dos carbonilos C10 ( $\delta_C$  175.0) y C13 ( $\delta_C$  173.8), quedando este último como ácido libre ya que la señal **H8** ( $\delta_H$  4.07) de la serina se acopló con C10 ( $\delta_C$  175.0). Por otro lado, tanto **H8** ( $\delta_H$  4.07) como el  $\alpha$ -metino de la treonina2 **H4** ( $\delta_H$  4.25) correlacionaban con C7 ( $\delta_C$  173.4).

Por otra parte, los protones del grupo metileno de la Gly ( $\delta_H$  4.25 y 3.63), correlacionaron con el carbonilo C3 ( $\delta_C$  172.9) de la Thr2 y con el C1 ( $\delta_C$  170.5). Por último, las correlaciones detectadas entre el protón **H19** ( $\delta_H$  6.02) con C1 ( $\delta_C$  170.5) y el **H18** ( $\delta_H$  5.77) con C17 ( $\delta_C$  171.1) y C21 ( $\delta_C$  161.7) permitieron localizar la Thr1.

Como no se pudo observar ninguna correlación que nos permitiese situar el anillo de cloropirrol, se recurrió al experimento bidimensional de LR-HSQMBC (Figura 204) para detectar correlaciones  $^1H$ - $^{13}C$  a más de tres enlaces. De esta forma, la realización de este experimento permitió detectar las correlaciones entre los protones **H24** ( $\delta_H$  6.26) y **H25** ( $\delta_H$  6.98) con el carbono C21 ( $\delta_C$  161.7) que nos permitieron completar la estructura plana del compuesto **14** tal como se muestra en la Figura 202.

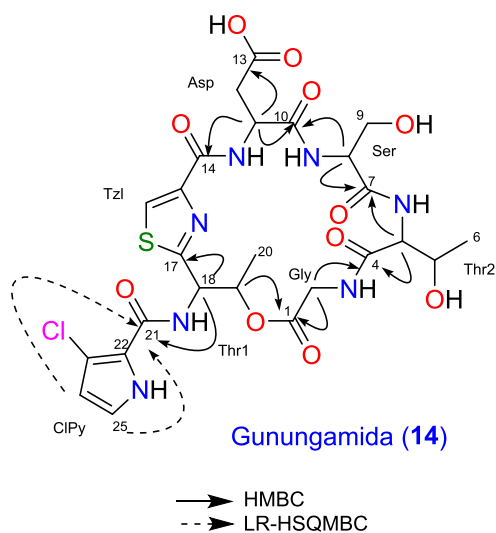


Figura 202. Estructura plana del compuesto 14 y correlaciones claves observadas en el gHMBC.

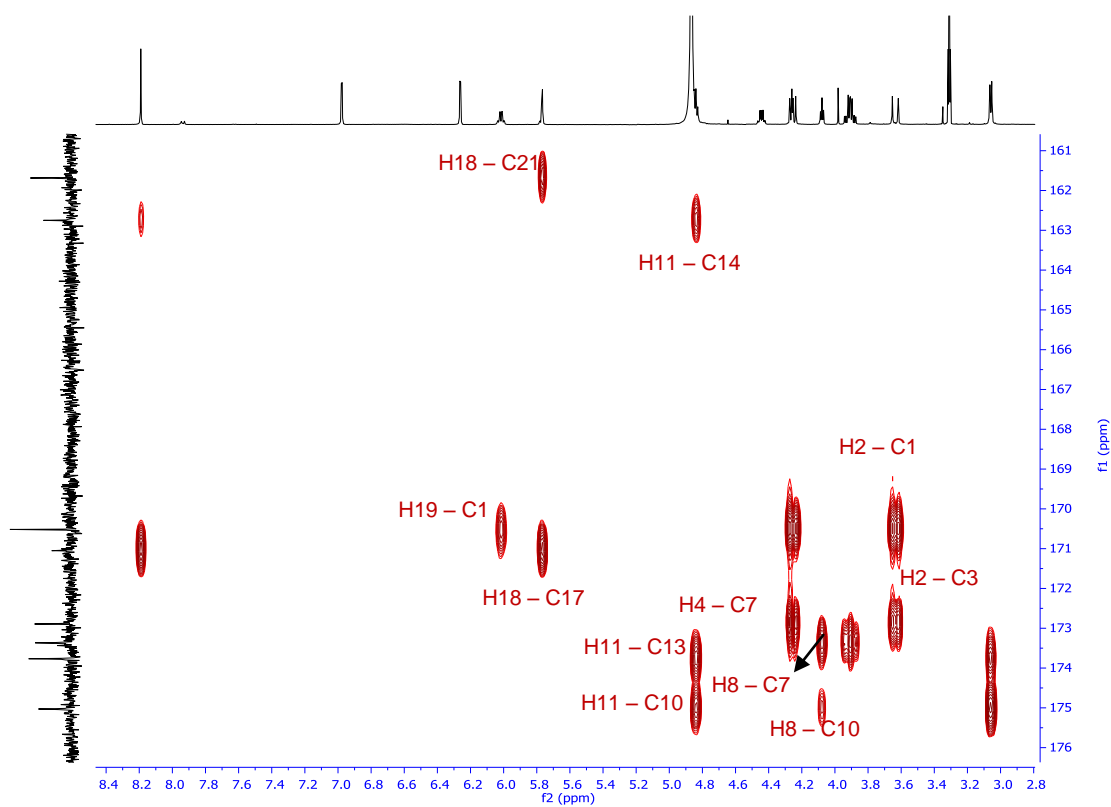


Figura 203. Correlaciones claves detectadas en la ampliación del espectro HMBC (CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 14.

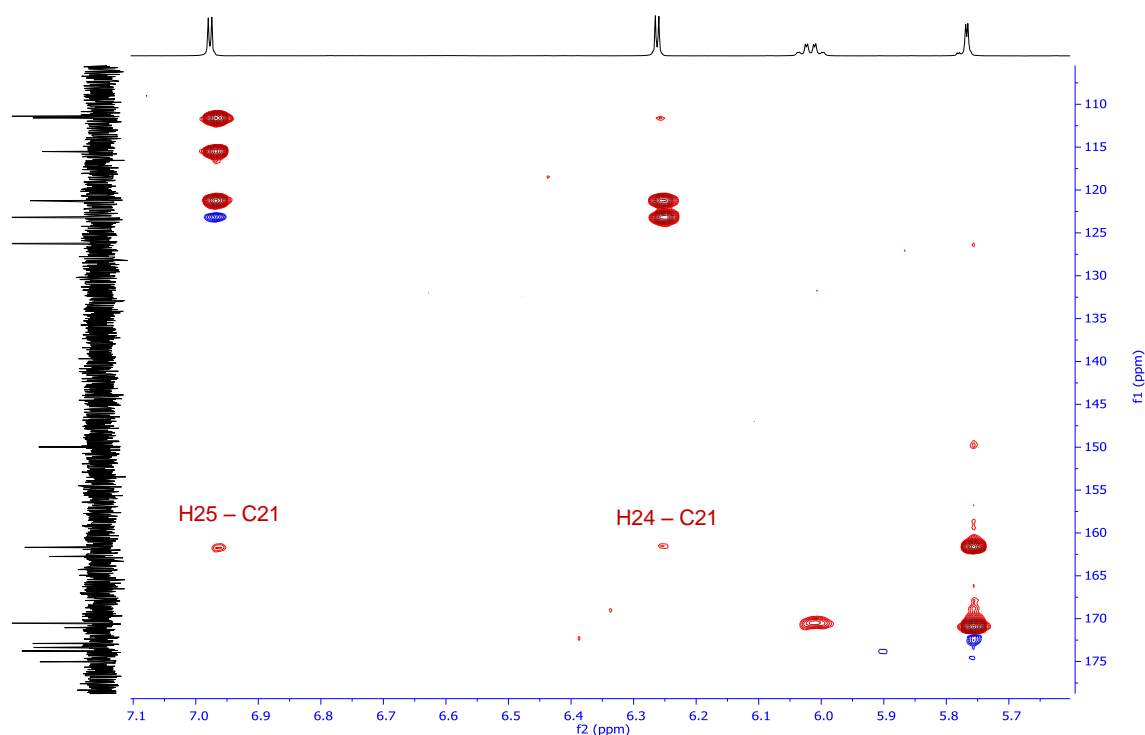


Figura 204. Ampliación clave del espectro LR-HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 14.

Un resumen de las correlaciones observadas en el experimento bidimensional HMBC entre los metilos de la molécula y los carbonos cercanos, se recogen en la Figura 205.

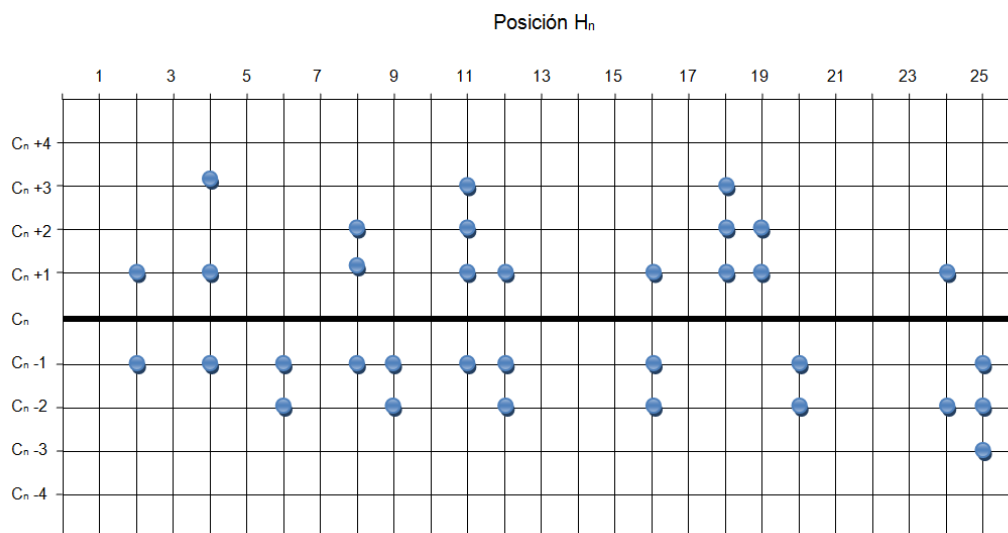
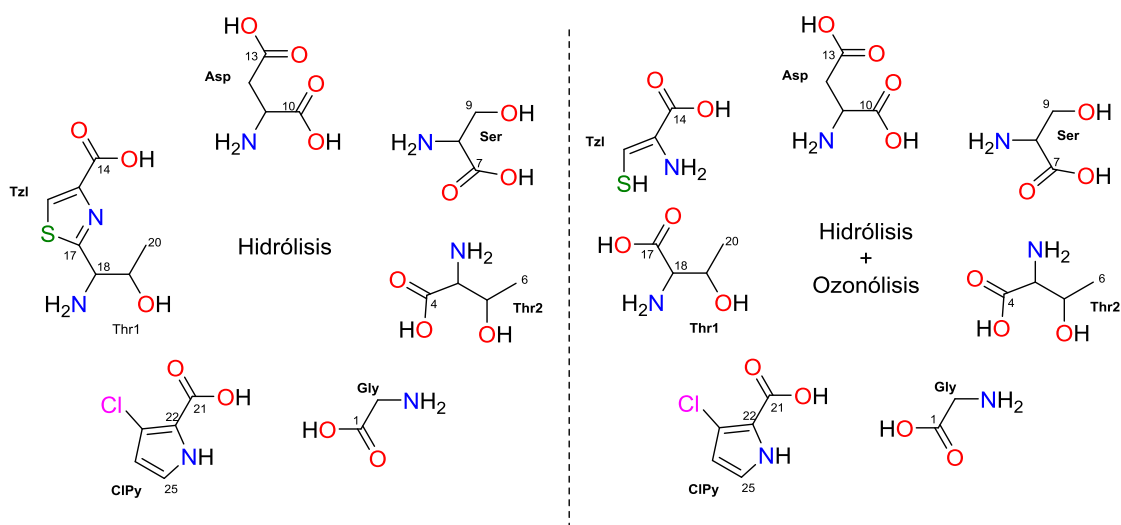


Figura 205. Correlaciones HMBC del compuesto 14.

7.2.4. Determinación de la estereoquímica absoluta de **14**

Mediante hidrólisis con HCl 6N de **14** seguido de derivatización con amida 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina (L-FDAA), se determinó la configuración absoluta de los diferentes aminoácidos presentes en la molécula, tras comparar sus tiempos de retención de los de los correspondientes patrones derivatizados. Para facilitar la búsqueda de los aminoácidos en el cromatograma obtenido en el HPLC-MS, se realiza una extracción del ión  $[M+H]^+$  de cada aminoácido derivatizado.

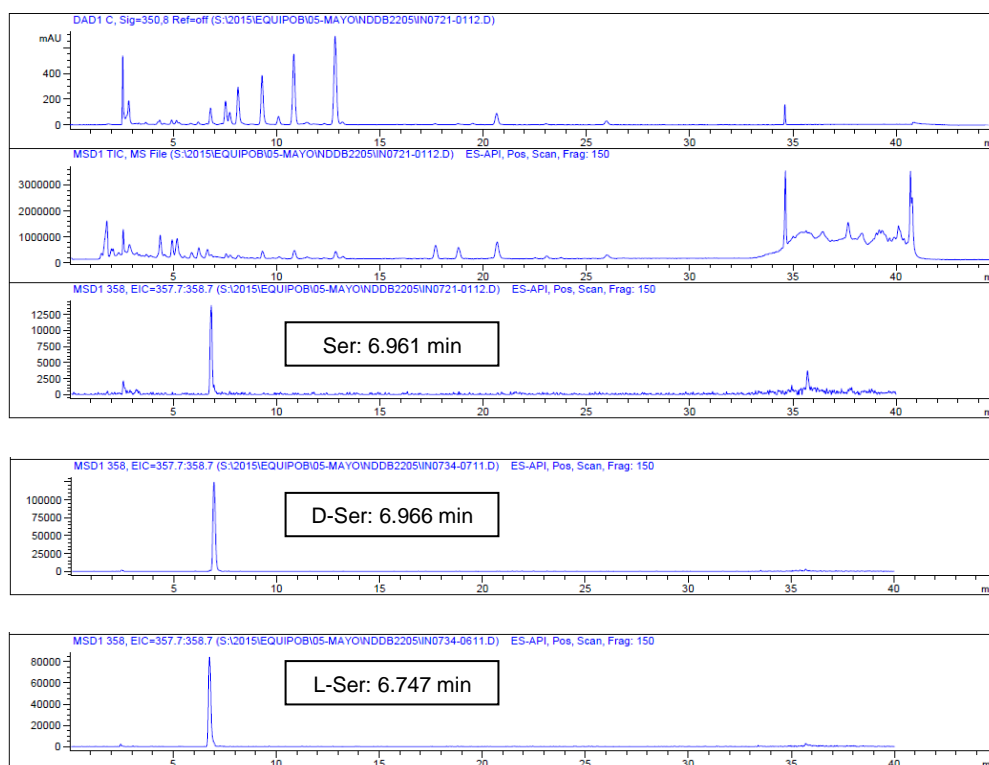
Dado que en estas condiciones el residuo de Thr1 unido al tiazol, permaneció intacto, el compuesto **14** se sometió además a ozonólisis, con el fin de romper el enlace de la Thr1 con el tiazol, seguido de hidrólisis ácida. De este modo, mediante este segundo proceso se logró conseguir todos los aminoácidos libres (Figura 206).



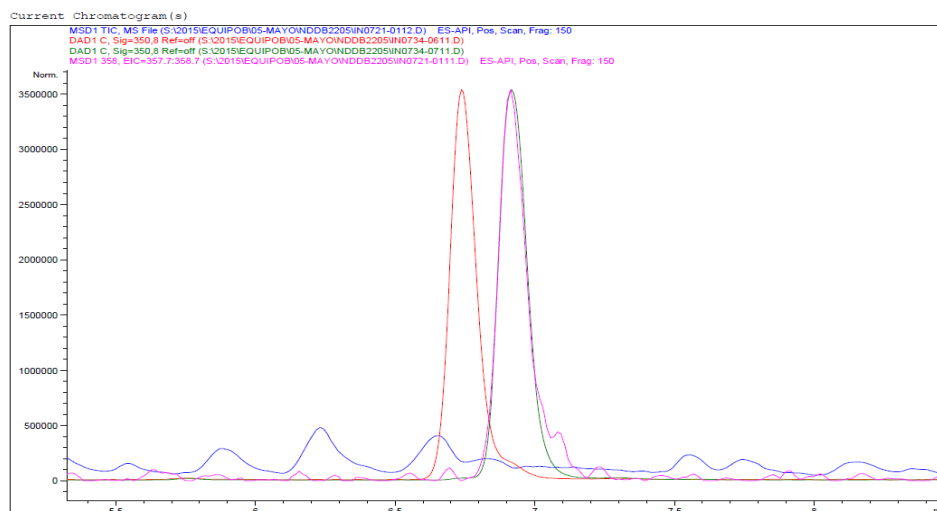
**Figura 206.** Aminoácidos libres tras los diferentes procesos químicos realizados sobre el compuesto **14**.

La detección de la treonina en el cromatograma de HPLC con un único tiempo de retención en ambos procesos, mediante hidrólisis ácida directa y ozonólisis seguida de hidrólisis ácida, permitió concluir que tanto la Thr1 como la Thr2 debían de poseer la misma estereoquímica.

La comparación del tiempo de retención de 6.961 minutos del ión de  $m/z$  358 correspondiente a la serina derivatizada con la de cada uno de sus patrones, permitió deducir que se trataba de la D-serina (Figura 207). En la Figura 208 se muestra la superposición de los picos cromatográficos correspondientes al de la serina derivatizada del compuesto **14** y los de cada uno de los dos patrones derivatizados de la serina.

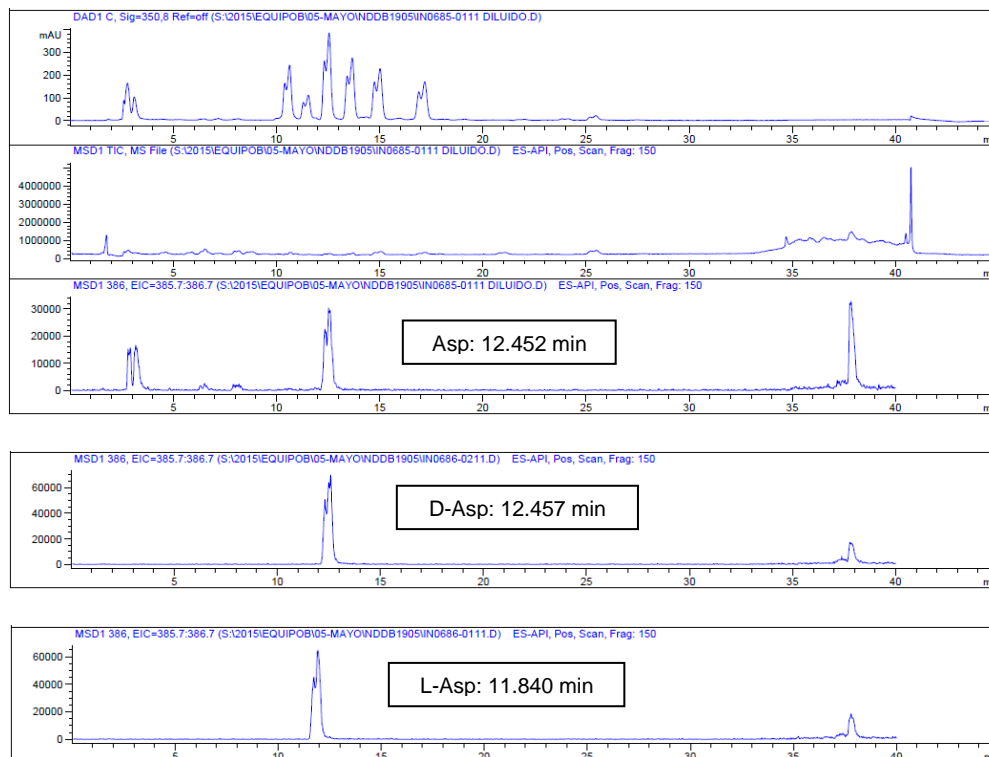


**Figura 207.** Comparación del tiempo de retención de la serina derivatizada del compuesto **14** con los de los patrones D y L-serina. Condiciones de HPLC: Gradiente de 20 a 50% de AcN en 30 min.



**Figura 208.** Superposición de los picos cromatográficos de las serinas derivatizadas de **14** (rosa), D-ser (verde) y L-ser (rojo).

Repitiendo el mismo proceso con el ácido aspártico derivatizado del compuesto **14**, mostró que el tiempo de retención de 12.452 minutos de su correspondiente ion a  $m/z$  386 coincidía con el del ácido D-aspártico (Figura 209).



**Figura 209.** Comparación del tiempo de retención del ácido aspártico derivatizado del compuesto **14** con los de los patrones D y L. Condiciones de HPLC: Gradiente de,20 a 50% de AcN en 30 min.



En el caso de la treonina, aunque se ensayaron distintas condiciones de HPLC no fue posible separar los cuatro posibles diastereoisómeros (Figura 210).

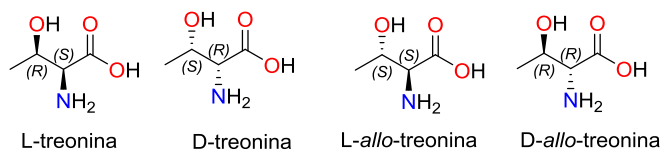


Figura 210. Isómeros de la treonina.

Aunque inicialmente se lograron separar bien los patrones derivatizados de la D y D-allo-treonina, los correspondientes a la L y L-allo-treonina prácticamente coelúan en el HPLC, coincidiendo ambas con el tiempo de retención de las treoninas derivatizadas del compuesto **14**.

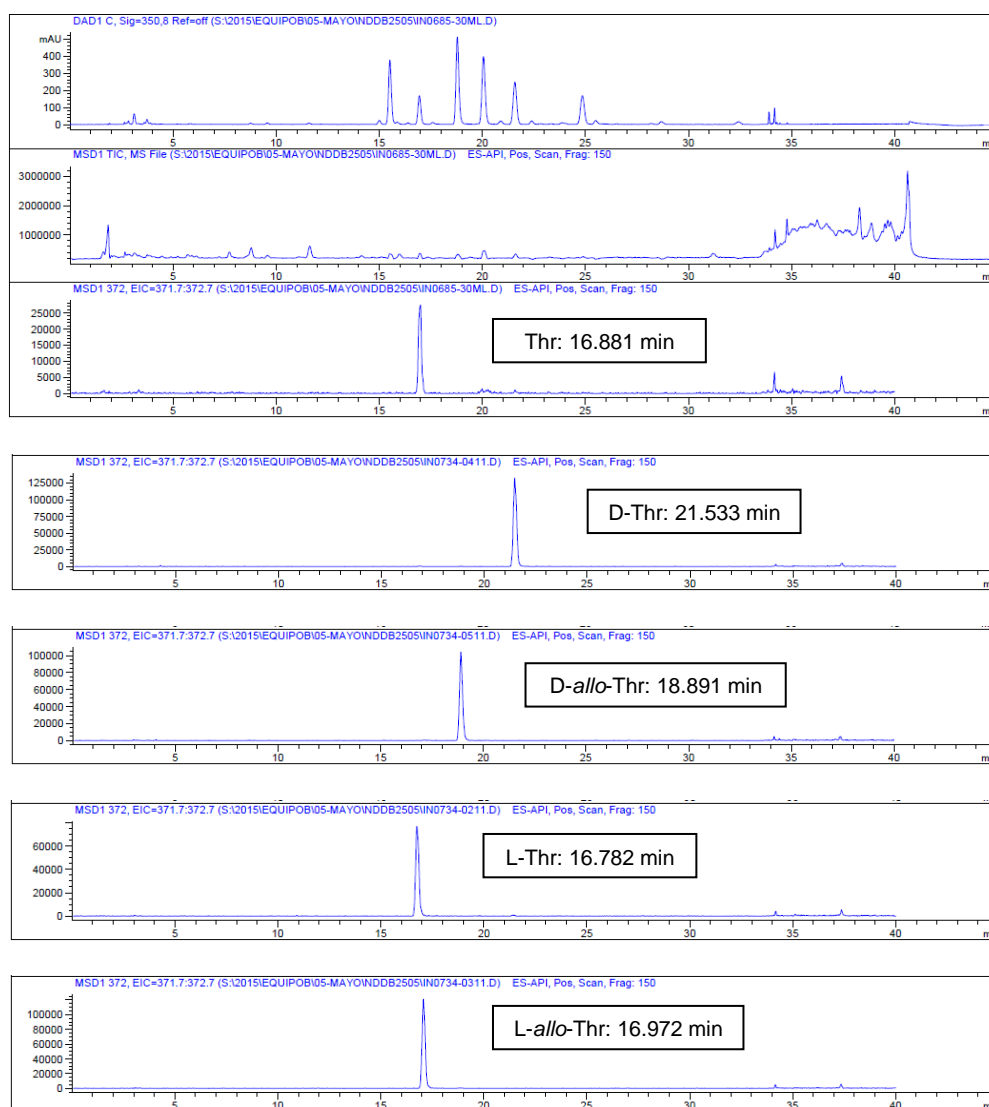


Figura 211. Comparación del tiempo de retención de las treoninas derivatizadas del **14** con los patrones D, D-allo, L y L-allo treonina, Condiciones de HPLC: Gradiente de 10 a 30% de AcN en 30 min.

Finalmente, se consiguió separar las L y L-*allo*-treoninas derivatizadas mediante el empleo de la UPLC usando una columna en fase reversa de tamaño de partícula más pequeño.

Al analizar el producto hidrolizado del compuesto **14** en estas nuevas condiciones se logró distinguir la presencia de un pico cromatográfico cuyo tiempo de retención coincidía con el del patrón de la L-*allo*-treonina (Figura 212).

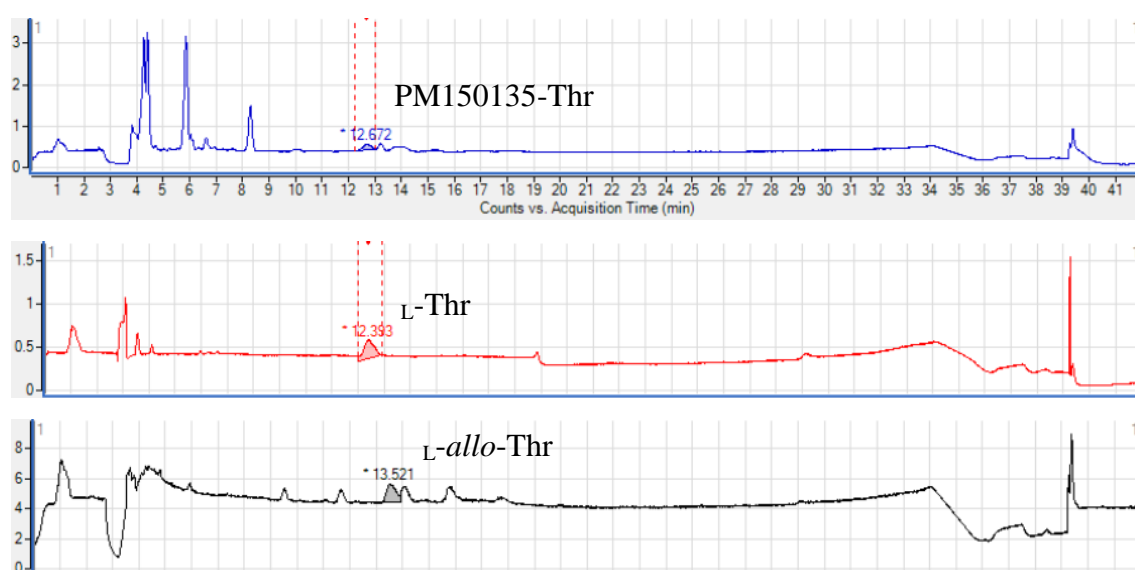
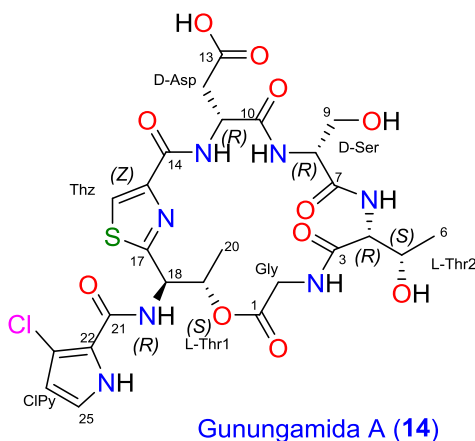


Figura 212. Comparación de los tiempos de retención de las treoninas derivatizadas en el UPLC.

Con todo este proceso, se consiguió completar la estereoquímica absoluta del compuesto **14**, al que hemos denominado gunungamide A, tal como se muestra en la Figura 213:



**Figura 213.** Estereoquímica absoluta del compuesto **14**.

La presencia de treoninas presenta una dificultad adicional ya que se han reportado casos en los que tiene lugar su epimerización durante la hidrólisis.<sup>140</sup>

Con el fin de evitar ese problema se propone que, previamente a la hidrólisis del compuesto que contiene treoninas, se realice un análisis previo de su estereoquímica mediante el método JBCA. De esta forma, la combinación de los dos métodos, JBCA y Marfey, ayudaría a determinar inequívocamente cuál de las cuatro posibles treoninas está presente en el compuesto en cuestión.

<sup>140</sup> M. J. Martín, R. Rodríguez-Acebes, Y. García-Ramos, V. Martínez, C. Murcia, I. Digon, I. Marco, M. Pelay-Gimeno, R. Fernández, F. Reyes, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 6754–6762.

Por esta razón, se aplicó una combinación de los métodos de Murata<sup>141</sup> y Marfey<sup>142</sup> en la determinación absoluta de los aminoácidos en el compuesto **14**. Se decidió comenzar con el estudio de su configuración relativa empleando el método de Murata, ya que nos permitiría descartar dos de los cuatro aminoácidos utilizando una técnica no destructiva. Se midieron las constantes homo y heteronucleares de los sistemas 1,2-disustituídos de las dos treoninas presentes en **14** siguiendo la metodología que se explica en el Capítulo II. Para medir las constantes de acoplamiento homonucleares se recurrió al experimento de RMN de <sup>1</sup>H, mientras que para las constantes de acoplamiento heteronucleares se emplearon los experimentos bidimensionales HSQC-HECADE y J-HMBC. Este proceso se realizó para cada una de las treoninas (Figura 214), ya que podían tener configuraciones diferentes.



**Figura 214.** Treoninas del compuesto **13**.

Para la Thr1, la constante de acoplamiento <sup>3</sup>J(H18,H19) es pequeña con un valor de 1.8 Hz. Mediante el experimento de HSQC-HECADE, se midieron las constantes <sup>2</sup>J(H18,C19) y <sup>2</sup>J(H19,C18) que presentaron un valor de -1.2 Hz, pequeño también, y la constante <sup>3</sup>J(H18,C20) de valor 1.2 Hz. Todos los valores se recogen en la Tabla 28.

**Tabla 28.** Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares del residuo de Thr1 en **14**.

Constante medida	RMN- <sup>1</sup> H	Etiqueta Sistema
<sup>3</sup> J(H18,H19)	+1.8	S
Constante medida	HECADE	
<sup>2</sup> J(H18,C19)	-1.2	S
<sup>2</sup> J(H19,C18)	-1.2	S
<sup>3</sup> J(H18,C20)	+1.2	S

<sup>141</sup> Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.

<sup>142</sup> Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591–596.

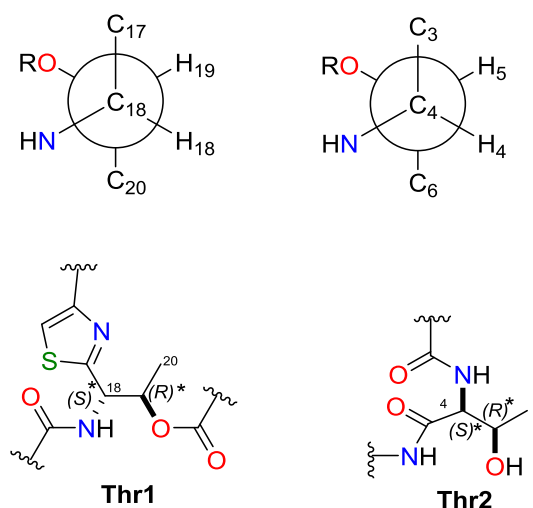
Para la Thr2 se obtuvieron una constante homonuclear  $^3J(\text{H4},\text{H5})$  de 2.5 Hz, que se consideró como un valor pequeño, y las constantes heteronucleares a dos enlaces  $^2J(\text{H4},\text{C5})$  y  $^2J(\text{H5},\text{C4})$  con valores de -3.8 Hz y -0.6 Hz respectivamente, que se clasificaron como medio-pequeño la primera y pequeña la segunda. La constante heteronuclear a tres enlaces  $^3J(\text{H4},\text{C6})$  resultó ser de 1.9 Hz, que se consideró como un valor pequeño.

Debido al valor mediano de la  $^2J(\text{H4},\text{C5})$ , se midió la constante  $^3J(\text{H5},\text{C3})$ , mediante el experimento de J-HMBC, para tener más valores disponibles. El valor obtenido para esta constante fue de 2.4 Hz, por lo que todos los valores fueron pequeños. Todos los valores se recogen en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares del residuo de Thr2 en 14.

Constante medida	RMN- $^1\text{H}$	Etiqueta Sistema
$^3J(\text{H4},\text{H5})$	+2.5	S
Constante medida	HECADE	
$^2J(\text{H4},\text{C5})$	-3.8	S/M
$^2J(\text{H5},\text{C4})$	-0.6	S
$^3J(\text{H4},\text{C6})$	+1.9	S
Constante medida	J-HMBC	
$^3J(\text{H5},\text{C3})$	+2.4	S

Con estos valores de las constantes de acoplamiento, la etiqueta obtenida para ambas treoninas es SSSSS por lo que sólo puede explicarse si consideramos que las treoninas adoptan el rotámero *gauche*- del isómero *sin*. Por tanto, la estereoquímica relativa de ambas treoninas es  $S^*R^*$ , por lo que podríamos descartar los diastereoisómeros *allo* con configuraciones SS ó RR.



**Figura 215.** Estereoquímica relativa de las treoninas del compuesto **14**.

El ensayo de la actividad citotóxica del compuesto **14** mostró que no es activo en las cuatro líneas estudiadas, pulmón (A-549), colon (HT-29), mama (MDA-MB-231) y páncreas (PSN-1), al mostrar valores de citotoxicidad mayores de 15  $\mu$ M para todas ellas.

**Tabla 30.** Actividad citotóxica del compuesto **14**.

Línea celular	GI <sub>50</sub>	TGI	LC <sub>50</sub>
A549	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M
HT-29	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M
MDA-MB-231	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M
PSN-1	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M	>15 $\mu$ M

## 7.2.5. Aplicación de la combinación JBCA y Marfey a stellatolido A

Con el fin de demostrar la utilidad de la combinación de ambos métodos en la determinación de la configuración absoluta de las treoninas en el caso de que estén presentes en el compuesto objeto de estudio, se aplicó esta metodología a stellatolido A (**15**),<sup>143</sup> compuesto de origen natural aislado de una esponja recogida en Madagascar con elevada actividad citotóxica y posteriormente sintetizado (Figura 216).

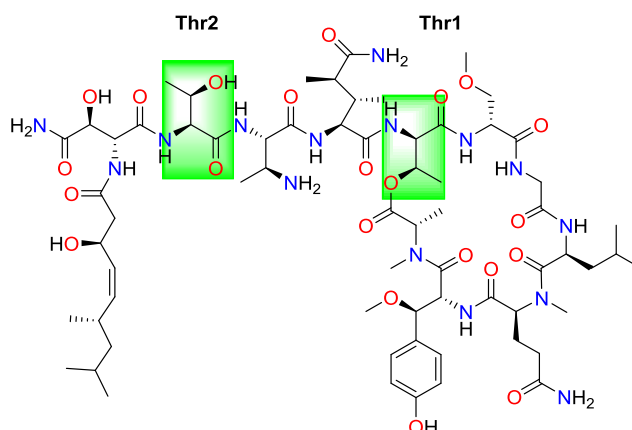


Figura 216. Estructura stellatolido A (**15**).

De la aplicación del método de Marfey sobre el stellatolido A (**15**) se dedujo que las dos treoninas presentes en su estructura eran *D-allo*-Thr. Cuando posteriormente se realizó su síntesis total se pudo comprobar por RMN que el compuesto sintético no coincidía con el natural. El análisis detallado de los espectros y una revisión bibliográfica indicó que podría haberse producido la racemización de las treoninas durante el proceso de hidrólisis para identificar los aminoácidos. Por ello, se repitió la hidrólisis de stellatolido A (**15**) en condiciones más suaves, detectándose la presencia de trazas de *L*-Thr. Finalmente, cuando se realizó nuevamente su síntesis total teniendo en cuenta la nueva configuración de la theronina se obtuvo un compuesto cuyos espectros de RMN y tiempo de retención en HPLC coincidían con los del natural.

<sup>143</sup> M. J. Martín, R. Rodríguez-Acebes, Y. García-Ramos, V. Martínez, C. Murcia, I. Digon, I. Marco, M. Pelay-Gimeno, R. Fernández, F. Reyes, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 6754–6762.

Las  $J_{H-C}$  de las dos treoninas presentes en **15** se obtuvieron mediante la realización del experimento de RMN “pure in-phase” (PIP-HSQMBC).<sup>144</sup>

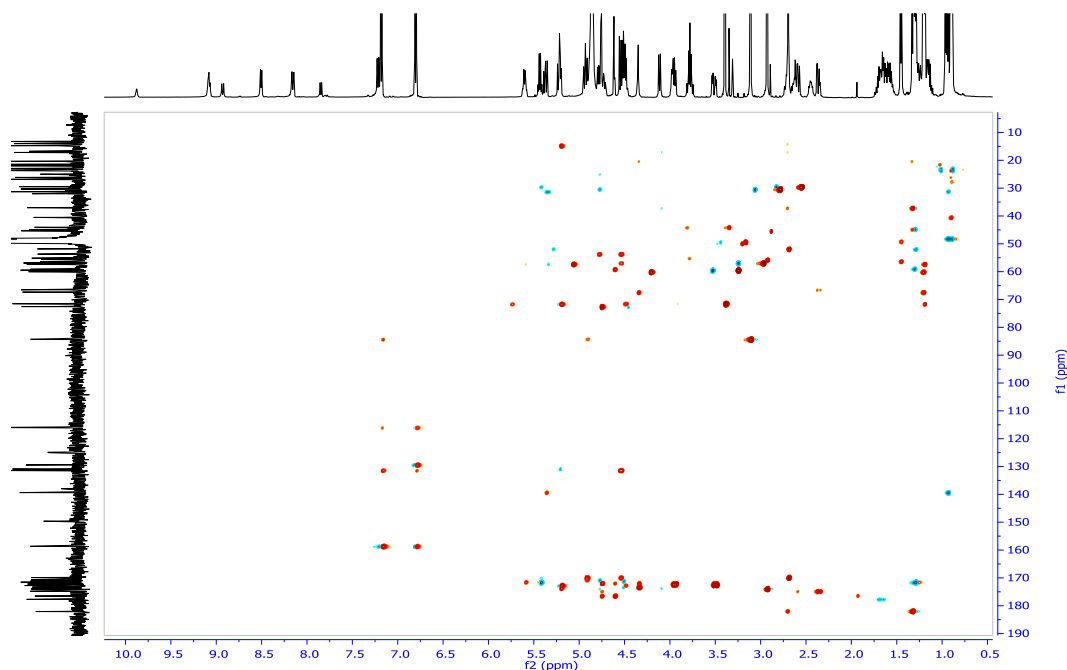


Figura 217. PIP-HSQMBC del compuesto **15** en CD<sub>3</sub>OD.

Se obtuvieron los siguientes valores mostrados en la Figura 218:

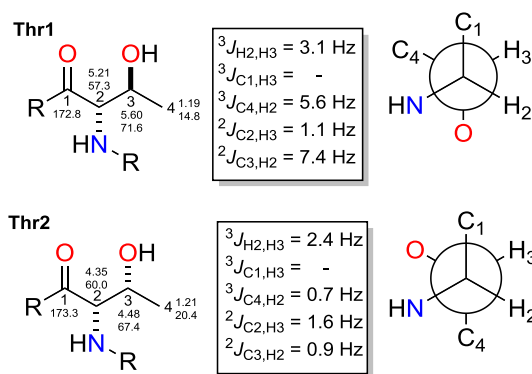


Figura 218. Análisis configuracional basado en  $J$ s de las treoninas presentes en **15**.

<sup>144</sup> L. Castañar, J. Saurí, R. T. Williamson, A. Virgili, T. Parella, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, 53, 8379–8382.



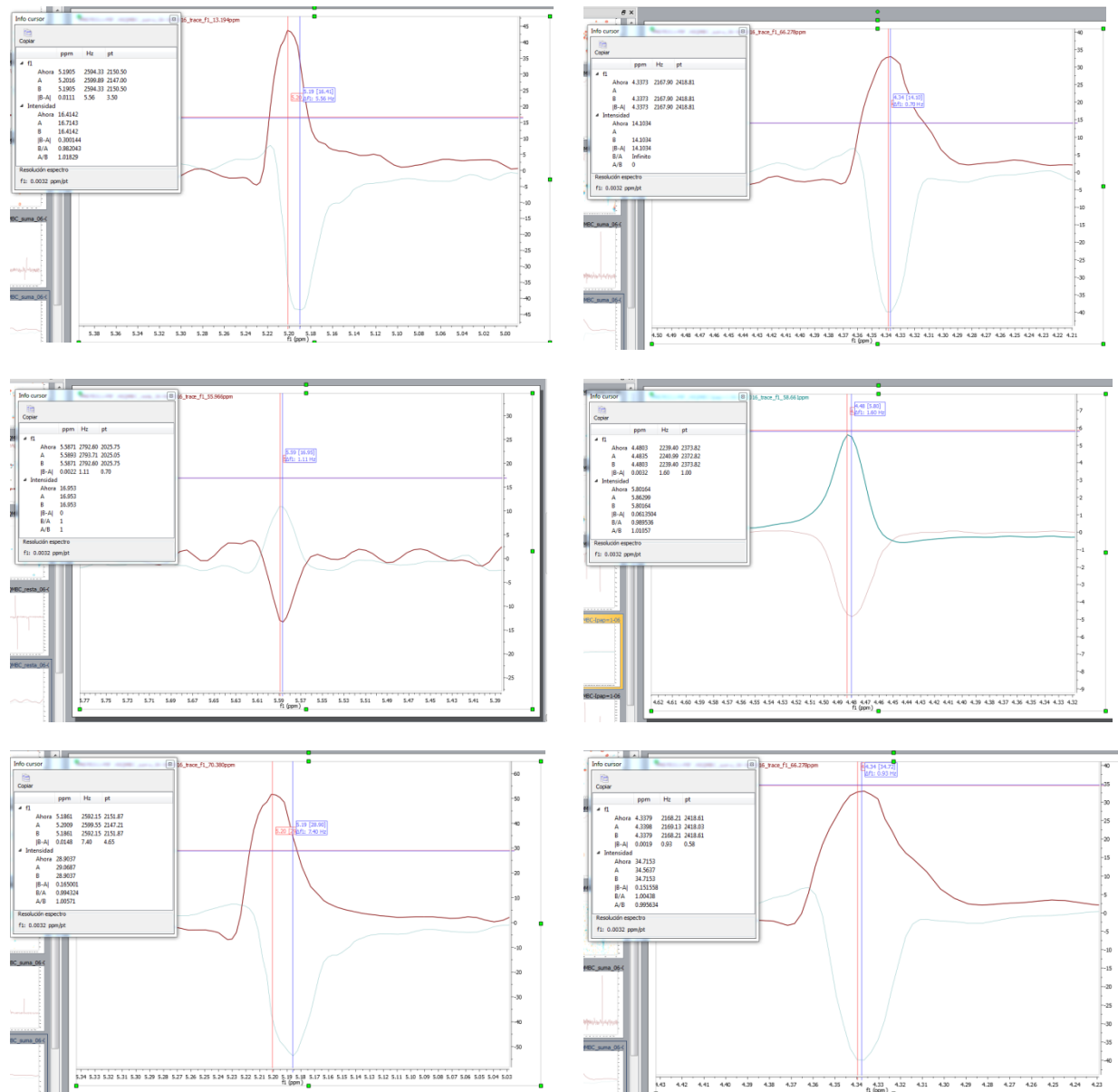
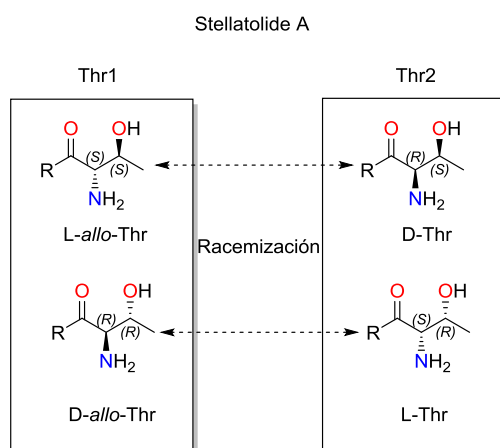


Figura 219. Trazas extraídas del PIP-HSQMBC de 15.

Los valores de las constantes homo y heteronucleares en el compuesto **15** medidos para el residuo de Thr1 indicaron que poseía una configuración *anti*, por lo que su estereoquímica relativa era  $S^*S^*$ . Sin embargo, los valores obtenidos para Thr2 indicaron que poseía una configuración *sin*, por lo que su estereoquímica relativa era  $R^*S^*$ . Estos resultados se contradicen con la configuración inicial de las treoninas en **15** mediante análisis de Marfey que indicaba únicamente la presencia de *D-allo*-Thr, ya que los valores obtenidos para la Thr2 no son compatibles con una configuración *allo*. La racemización de Thr2 durante la hidrólisis explica el hecho de que solo se detectase la *D-allo*-Thr mediante el método Marfey (Figura 220).



**Figura 220.** Configuraciones de los cuatro isómeros de treonina y posibles racemizaciones.

De este modo, se demuestra que la combinación del método de Marfey y JBCA en compuestos que contienen treoninas o aminoácidos con más de un centro quiral, puede permitir detectar racemizaciones durante la hidrólisis, disminuir el número de patrones necesarios y/o colocar aminoácidos iguales con diferente estereoquímica dentro de una misma molécula.

## *CONCLUSIONES*

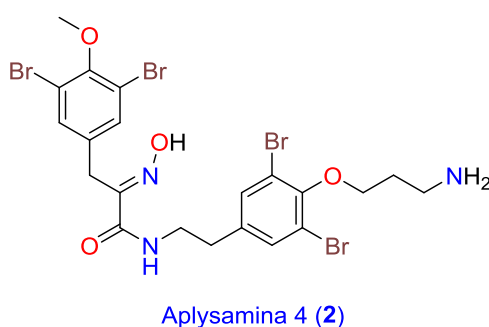
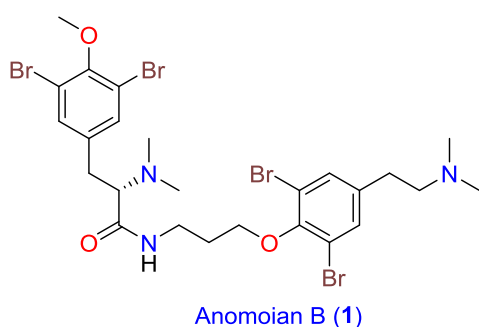
### CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de esta tesis es el aislamiento y elucidación de nuevos compuestos con actividad citotóxica, procedentes de esponjas. Con este fin, se seleccionaron seis esponjas recolectadas en Indonesia, aislándose un total de 14 compuestos puros.

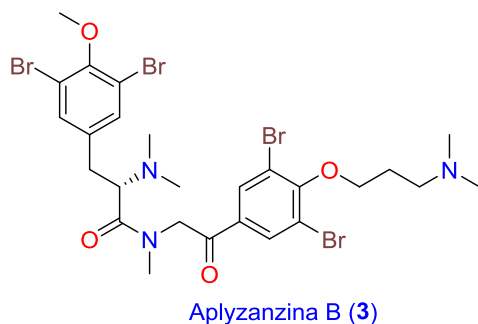
- Las estructuras de los compuestos aislados fueron determinadas principalmente mediante espectrometría de masas y RMN.
- El estudio de la estructura tridimensional de cada compuesto se realizó mediante un estudio exhaustivo de RMN, propiedades físicas, derivatizaciones químicas, comparaciones bibliográficas y cálculos computacionales.
- Para la determinación de la estereoquímica de los distintos centros quirales se realizaron diversas aproximaciones: método de Mosher, método de Marfey, JBCA, cálculos computacionales...
- Se evaluó la actividad citotóxica de todos ellos en un panel de líneas celulares de los tumores más relevantes, encontrándose actividades del rango micromolar en la mayoría de los casos.
- El trabajo realizado se presentó en congresos nacionales e internacionales, tanto en formato póster como en presentaciones orales.
- Todas las moléculas nuevas aisladas se han publicado o van a ser publicadas en revistas científicas de alto factor de impacto dentro del campo de los productos naturales.
- A continuación, se detallan las conclusiones alcanzadas para cada uno de los capítulos presentados en esta tesis doctoral.

Capítulo II:

De la esponja *Hexadella* sp. se ha aislado un nuevo compuesto al que llamamos anomoian B (1), junto con el compuesto conocido aplysamina 4 (2). Este nuevo derivado de bromotirosina presenta un centro quiral, cuya estereoquímica se resolvió mediante comparación de su poder rotatorio con el de otros compuestos relacionados. Este compuesto presenta actividad citotóxica de rango micromolar. El estudio preliminar de su mecanismo de acción indicó que induce apoptosis sin generar especies oxidativas.

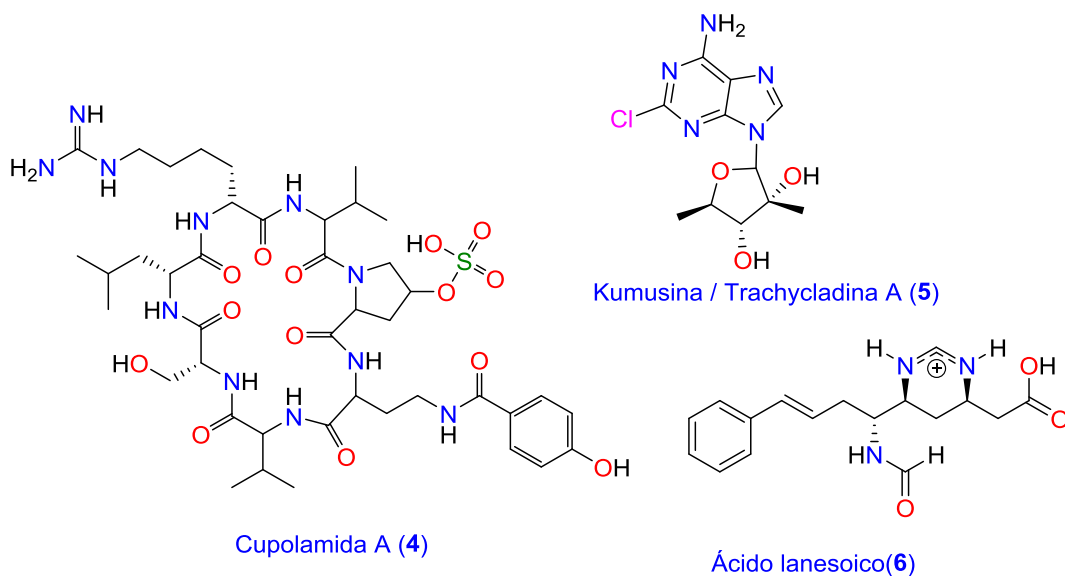
Capítulo III:

De la asociación de esponjas *Jaspis* sp. y *Bubaris* sp. se aisló el compuesto nuevo aplizanzina B (3). Este compuesto muestra actividad citotóxica de rango micromolar, con un mecanismo similar a anomoian B (1). Un estudio inicial estructura-actividad, indicó que la presencia de la unidad de bromotirosina, no era suficiente para mostrar actividad citotóxica.



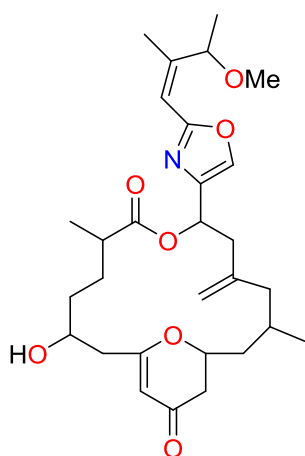
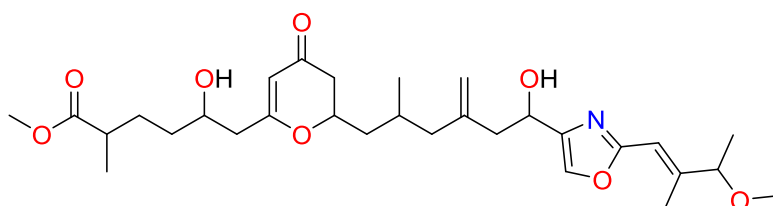
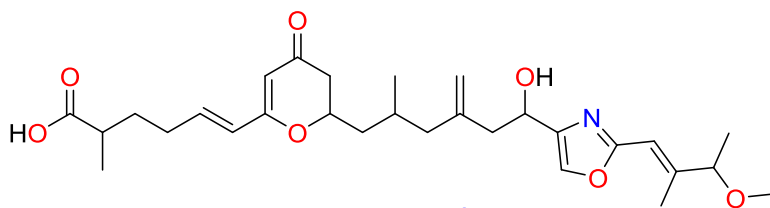
Capítulo IV:

Del estudio de la esponja *Theonella* sp. hemos podido aislar los compuestos conocidos cupolamida A (**4**) y kumusina/trachycladina A (**5**) junto con un nuevo compuesto al que hemos denominado ácido lanesoico (**6**). Este compuesto presenta una estructura muy novedosa, formada por un alcaloide zwiteriónico con un anillo poco usual de 1,4,5,6-tetrahidropirimidina. Su configuración relativa se estableció mediante un extensivo análisis espectral, junto con el análisis de sus constantes de acoplamiento y cálculos computacionales DFT. Este compuesto mostró actividad citotóxica moderada en células tumorales de páncreas. El trabajo realizado en este capítulo se publicó “*Org. Lett.* **2016**, *18*, 5832–5835” y fue seleccionado dentro del “HOT off the press” en “*Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 130-134”.



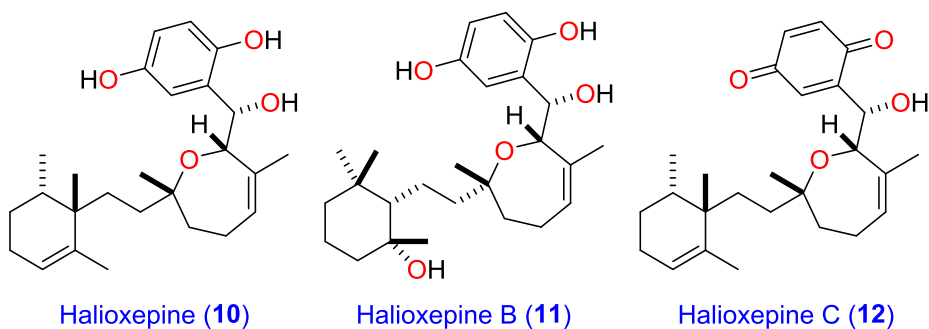
Capítulo V:

Del estudio de la esponja *Neopeltidae* se aislaron dos compuestos nuevos que se denominaron enigmazol C (**7**) y D -(**9**). Enigmazole C (**7**) pertenece a la misma familia que enigmazol A, mientras que su análogo enigmazol D (**9**) se corresponde a un análogo abierto. También se aisló el compuesto **8** como un artefacto, producto de degradación de enigmazol C (**7**). Las estructuras de los nuevos compuestos se dedujeron mediante RMN y espectrometría de masas, mientras que para determinar la configuración absoluta de enigmazol C (**7**) se necesitó recurrir a derivatizaciones químicas y cálculos computacionales. Enigmazol C (**7**) y D (**9**) mostraron una moderada actividad citotóxica, mientras que el compuesto **8**, producto de degradación de enigmazol C, resultó ser inactivo.

Enigmazol C (**7**)Compuesto **8**Enigmazol D (**9**)

Capítulo VII:

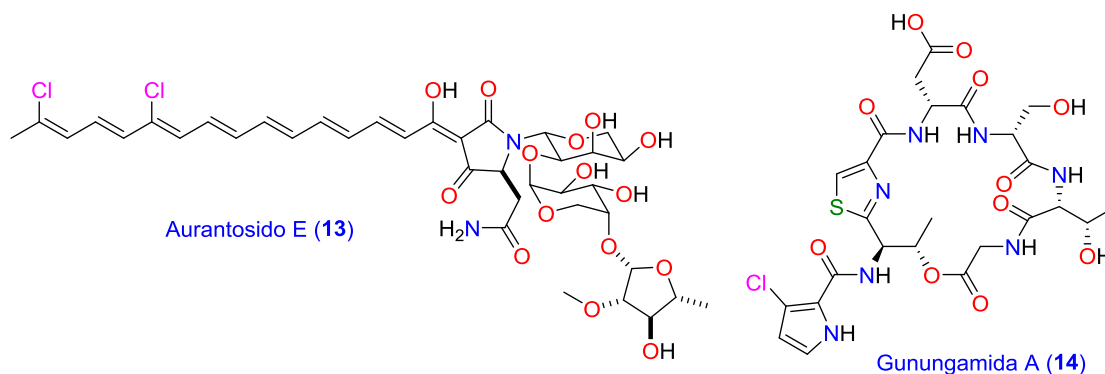
De la esponja *Haliclona (Reniera)* sp. se aisló el compuesto conocido como halioxepina A (**10**), junto con dos nuevos derivados, halioxepina B (**11**) y C (**12**). La estereoquímica relativa de halioxepinas A-C (**10-12**) se determinó mediante RMN, comparaciones bibliográficas, estudio de las constantes de acoplamiento y cálculos computacionales. La configuración de la halioxepina C (**12**) se resolvió mediante derivatización química. Ambos compuestos mostraron actividad citotóxica de rango micromolar en el panel de cuatro líneas tumorales. Los estudios realizados con halioxepina A-C (**10-12**).





### Capítulo VII:

De la esponja *Discoderma* sp. se aisló el compuesto conocido aurantosido E (**13**), junto al nuevo depsipéptido que se denominó gunungamida A (**14**). El estudio de la configuración absoluta de gunungamida A (**14**) se llevó a cabo mediante una combinación del método de Marfey para aminoácidos, junto con el estudio de las constantes de acoplamiento  $J_{H-C}$  mediante el método descrito por Murata. El uso combinado de estas dos metodologías permite hacer un estudio preliminar sobre los amino ácidos treoninas con el fin de solucionar los problemas que surgen en el estudio de su estereoquímica con el método de Marfey: la difícil separación de sus diastereoisómeros y la posible racemización en medio ácido. El proceso de aislamiento y elucidación, así como la aplicación del proceso con el compuesto citotóxico stellatolido A. Gunungamida A (**14**) muestra una actividad citotóxica muy baja frente a las líneas tumorales ensayadas.





*PARTE*  
*EXPERIMENTAL*

## PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de resonancia magnética nuclear se llevaron a cabo en los espectrómetros Varian “Unity 500” (500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), Varian “Unity 400” (400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) y Bruker Avance 500 (500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) con criosonda dual  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  y sonda banda ancha BBI ó Bruker Avance III 400 MHz con sonda BBO. Los disolventes deuterados utilizados fueron:  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_3\text{OH}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$  y  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Los desplazamientos químicos fueron determinados en la escala  $\delta$  en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en hercios (Hz). Los experimentos HSQC-HECADE se adquirieron con 32 scans y 256 incrementos usando un tiempo de mezcla de 40-75 ms y 4K puntos, mientras que los  $J$ -HMBC se adquirieron con 16 scans, 100-200 incrementos y 2K puntos en F2.

Las rotaciones ópticas fueron medidas usando un polarímetro Jasco P-1020. Los espectros de UV se midieron usando un espectrómetro Agilent 8453 UV-vis. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron de un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR con muestreador ATR.

Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron mediante un espectrómetro de cromatografía Agilent 6230 TOF LC/MS ó en un equipo QqQ-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite, mientras que los de baja resolución con un espectrómetro Agilent 1100 Series LC/MSD con una corriente de 150 V en el fragmentador.

Los equipos de HPLC utilizados corresponden a las series Agilent 1100 y 1200 acoplados a un detector de fotodiodos y usando diversas columnas de fase reversa.

## Parte experimental Capítulo II

### Recolección de la muestra

La esponja *Hexadella* sp. cf *Hexadella inidica* fue recolectada en Sanguie (Indonesia) en mayo de 2010 cerca de la isla de Para (125° 30.496' E 03° 03.603'N) mediante el uso del sistema de buceo rebreather entre los 50 y 100 m. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz Lespe del Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Esta muestra fue codificada con el código ORMA090313.

### Extracción y fraccionamiento

De los 62 g recogidos, se cogieron 47 g que se extrajeron tres veces con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua, obteniéndose 3.2 g de peso en seco del extracto orgánico y 0.8 g del extracto acuoso. La fracción orgánica se pasó por una placa filtrante con gel de sílice en fase invertida sometida a vacío (VLC-RP) utilizando diferentes mezclas de disolventes (puros o en mezcla 1:1) en orden decreciente de polaridad (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O:MeOH/MeOH/MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los pesos obtenidos de la extracción acuosa (A), la orgánica (DM) y las diferentes fracciones procedentes de la VLC-RP (RP1-5) son los siguientes:

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
0.8 g	3.2 g	915 mg	988 mg	565 mg	159 mg	93 mg

### Cromatografía de la fracción RP3

La fracción RP3 se sometió a un HPLC preparativo con las siguientes condiciones: columna XBridge Prep C18 (19 x 150 mm 5 µm), flujo 15 mL/min y como fase móvil isocrática de 25% AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA durante 3 min seguido de gradiente del 25 hasta 76% de AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA en 11 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Cantidad (mg)	63	59	263	28	37	17
t <sub>R</sub> min	2.0	3.0	7.5	11.0	12.5	15.0

La fracción H3 se purificó mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna SunFire C18 (10 x 150 mm 5 µm), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 30% AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA durante 3 min seguido de gradiente del 30 hasta 70% de AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA en 10 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2
Cantidad (mg)	17.6	6.7
t <sub>R</sub> min	11.5	12.5
Compuesto	1	2

### Anomoian B (1)

Sólido incoloro amorfo

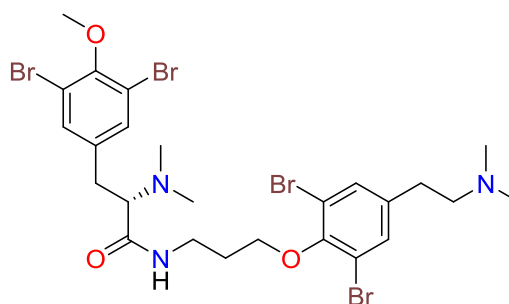
[α]<sub>D</sub> +10.5° (c 0.1, MeOH)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> 276 y 284 nm

IR u<sub>max</sub> 2929, 1673, 1473, 1261, 1201, 1133, 834, 800 y 722 cm<sup>-1</sup>

(+)-ESIMS m/z 740/742/744/746/748 en relación 1:2:3:2:1 [M+H]<sup>+</sup>; 373 [M/2+H]<sup>+</sup> ver Figura 28

(+)-HRTOFMS m/z 739.9338 [M+H]<sup>+</sup>. Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>34</sub><sup>79</sup>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, m/z 739.9328 Δm = 0.0010 uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 29		55
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 30		55
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 4	56
RMN HSQC	Figura 31		57
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 33		58
RMN HMBC	Figura 35		60
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY- Ampliado	Figura 37		61

### Aplysamina 4 (2)

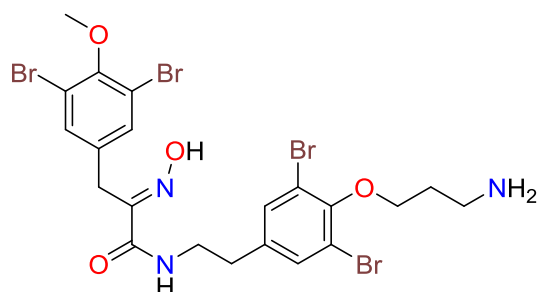
Sólido blanco

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  218, 222 y 274 nm

IR  $\nu_{\text{max}}$  3400, 2990, 1670, 1630, 1530 y 1460  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  697, 699, 701, 703, 705 en relación 1:2:3:2:1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 46)

(+)-HRTOFMS  $m/z$  697.8514  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}^{79}\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_4$ ,  $m/z$  697.8495  $\Delta m = 0.0019$  uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 47		68
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 48		68
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 6	69
RMN HSQC	Figura 49		70
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 51		71
RMN HMBC	Figura 52		72

### Parte experimental Capítulo III

#### Recolección de la muestra

La asociación de esponjas *Jaspis* sp. cf *lutea* y *Bubaris* sp. se recolectaron en Lombok (Indonesia) en septiembre de 2012, cerca de Pulau Saujung (117° 32.288'E 07° 20.375'S) usando el sistema de buceo de rebreather entre los 50 y 100 m de profundidad. El estudio taxonómico de ambas esponjas se llevó a cabo en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la Dra. María Jesús Uriz Lespe. Debido a la imposibilidad de separar las dos esponjas, estas se estudiaron conjuntamente, codificándolas como ORMA119230.

#### Extracción y fraccionamiento

Entre las dos esponjas se recolectaron 249 g, de los que 229 g se extrajeron tres veces con una mezcla de MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua, obteniéndose 9.7 g de peso en seco de extracto orgánico y 0.5 g de extracto acuoso. La fracción orgánica se pasó por una placa filtrante con gel de sílice en fase invertida sometida a vacío (VLC-RP), utilizando diferentes mezclas de disolventes (puros o en mezcla 1:1) en orden decreciente de polaridad (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O:MeOH/MeOH/MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los pesos obtenidos de la extracción acuosa (A), la orgánica (DM) y las diferentes fracciones procedentes de la VLC-RP (RP1-5) son los siguientes:

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
0.5 g	9.7 g	1.97 g	2.64 g	1.88 g	2.33 g	80 mg



La fracción RP3 se purificó mediante cromatografía en columna rápida empleando 40 g de gel de sílice de fase reversa C18 y como fase móvil un gradiente desde el 100% de agua hasta el 100% de acetonitrilo, con lavado final de MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH con TFA 0.1%.

Fracción	CFSi1	CFSi2	CFSi3	CFSi4	CFSi5	CFSi6	CFSi7	CFSi8
Cantidad (mg)	398	315	214	184	56	45	257	86
t <sub>R</sub> min	2.5	7.5	11.5	15	20	27	MeOH	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

La fracción CFSi7 se purificó mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna XBridge C18 (10 x 250 mm 5µm), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 20% AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA durante 3 min seguido de gradiente del 20 hasta 84% de AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA en 16 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Cantidad (mg)	12	130	8.5	11.5	8	11
t <sub>R</sub> min	5	13	15.5	16.5	19	21
Compuesto	3					

### Aplyzanzina B (3)

Sólido marrón amorfo

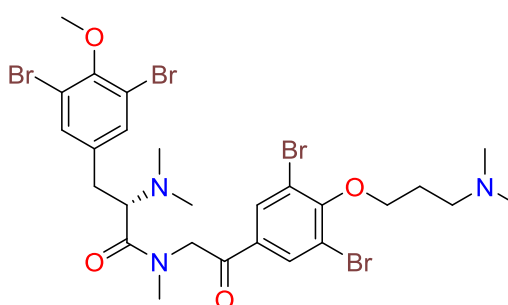
[α]<sub>D</sub> +47.5° (c 0.1, MeOH)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> 259 nm

IR u<sub>max</sub> 2972, 1684, 1544, 1474, 1424, 1261, 1200 y 1130 cm<sup>-1</sup>

(+)-ESIMS m/z 767/769/771/773/775 ratio 1:2:3:2:1[M+H]<sup>+</sup>; 386 [M/2+H]<sup>+</sup> ver Figura 58

(+)-HRTOFMS m/z 767.9272. Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>34</sub><sup>79</sup>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, m/z 767.9277 Δm = 0.0005 uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 59		83
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 60		83
RMN HSQC	Figura 61		84
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 8	85
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 63		87
RMN HMBC	Figura 64		88
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY- Ampliado	Figura 67		90

### Hidrólisis de 3

La muestra (20 mg) evaporada en un vial de reacción de 1 mL, se deja 72 h a 110°C en agitación en una disolución de 6N de HCl. Se evapora el disolvente y se purifica en HPLC.

### Mecanismo de acción

#### *Inhibición de las histonas deacetilasas (HDAC)*

Las células estudiadas se trataron a una concentración 10 nM, 100 nM y 1  $\mu\text{M}$  durante 24h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se lisaron las células con 50 $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (RIPA). Se centrifugaron a velocidad máxima durante 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteínas de cada lisado se cuantificó mediante BCA, con el fin de normalizar la carga de cada una de ellas. De cada una de las muestras se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína en 10  $\mu\text{L}$  de los cuales 2  $\mu\text{L}$  pertenecen a buffer de carga. Las muestras se centrifugaron y se calientan en un termoblock durante 5 min a 95°C, antes de centrifugarlas por última vez. Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Se detecta Acetil-H4 mediante western blot, donde se utilizó tubulina como control de carga y tricostatin A como control positivo.

### *Inducción de apoptosis a través de la ruta de las caspasas*

Los compuestos **1** y **3** se incuban a concentraciones de 10 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M en presencia de un fragmento de ADN desnudo de 250 pb durante 1h a 37°C. Se utiliza un gel de agarosa para observar su migración y el compuesto PM01183 como control positivo.

Las células estudiadas se trataron a una concentración de 10 y 20  $\mu$ g/mL durante 24 h y 30 h para la línea celular HT-29, 24h para MDA-MB-231y 48h para A-549, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se lisaron las células con 50 $\mu$ L de tampón de lisis (RIPA). Se centrifugaron a 1000 rpm durante 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteínas de cada lisado se cuantificó mediante BCA, con el fin de normalizar la carga de cada una de ellas. De cada una de las muestras se cargaron 20  $\mu$ g de proteína en 10  $\mu$ L de los cuales 2  $\mu$ L pertenecen a buffer de carga. Las muestras se centrifugaron y a continuación se calentaron en un termoblock durante 5 min a 95°C, antes de centrifugarlas por última vez. Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS al 8% para PARP y del 15% para  $\gamma$ -H2AX. Se detectó la fragmentación de PARP y aparición de  $\gamma$ -H2AX mediante western blot, donde se utilizó tubulina como control de carga. El pretratamiento celular con NAC se realizó a una concentración de 20  $\mu$ g/mL.

## Parte experimental Capítulo IV

### Recolección de la muestra

La esponja *Theonella* sp. cf *swinhoei* se recolectó en Lanes (Indonesia) en octubre de 2011, cerca del islote Salanro (120° 47.798'E 01° 20.256'N) usando el sistema de buceo de rebreather entre los 50 y 100 m de profundidad. El estudio taxonómico de ambas esponjas se llevó a cabo en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la Dra. María Jesús Uriz Lespe. La esponja se codificó como ORMA108755.

### Extracción y fraccionamiento

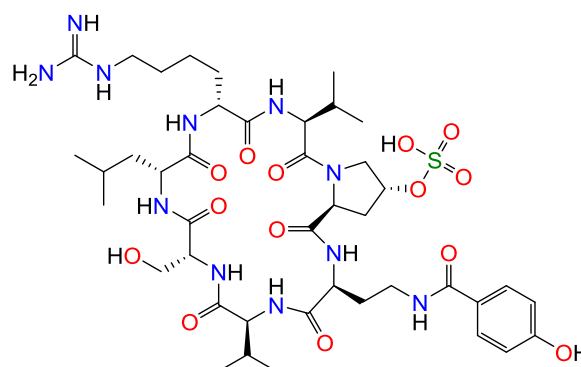
De los 87 g recogidos, se estudiaron 77 g que se extrajeron tres veces con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua, obteniéndose 2.4 g de peso en seco del extracto orgánico y 0.2 g del acuoso. La fracción orgánica se pasó por una placa filtrante con gel de sílice en fase invertida sometida a vacío (VLC-RP), utilizando diferentes mezclas de disolventes (puros o en mezcla 1:1) en orden decreciente de polaridad (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O:MeOH/MeOH/MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los pesos obtenidos de la extracción acuosa (A), la orgánica (DM) y las diferentes fracciones procedentes de la VLC-NP (RP1-5) son los siguientes:

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
0.2 g	2.4 g	1.3 g	530 mg	136 mg	128 mg	17 mg

La fracción RP3 se purificó mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna Atlantis C18 (10 x 150 mm 10  $\mu$ m), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 15% AcN/H<sub>2</sub>O durante 3 min seguido de gradiente del 15 hasta 55% de AcN/H<sub>2</sub>O en 20 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
Cantidad (mg)	7.1	4.1	5.4	3.8	9.3	4.1	9.8	3.9	7.2	4.6	8.1
t <sub>R</sub> min	3	5.5	10	12	13.5	15	16	17	18	22	25
Compuesto	5			6			4				

#### Cupolamida A (4)



Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D -128^\circ$  (c 0.05, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  253 nm

(+)-ESIMS  $m/z$  982  $[M+H]^+$ ; 902  $[M-HSO_3]^+$  y 452  $[M/2+H]^+$  ver Figura 94

(+)-HRTOFMS  $m/z$  982.4664. Calculado para C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub>S,  $m/z$  982.4662  
 $\Delta m = 0.0002$  uma.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de <sup>1</sup> H	Figura 95		116
RMN de <sup>13</sup> C	Figura 96		116
Datos de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C		Tabla 11	117
RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY- Ampliado	Figura 97		118
RMN 1D-TOCSY	Figura 98		119

### Kumusina/trachycladina A (5)

Sólido incoloro amorfo

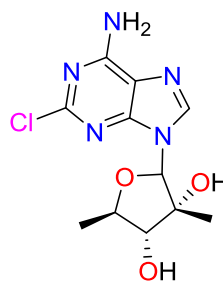
$[\alpha]_D -19.6^\circ$  (c 0.5, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  264 nm

IR  $\nu_{\max}$  3325, 3185, 1645, 1595, 1310 y 1065  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  322/324  $[M+Na]^+$  relación 3:1 y 300/302 relación 3:1  $[M+H]^+$  ver Figura 99

(+)-HRTOFMS  $m/z$  300.0866. Calculado para  $C_{11}H_{14}ClN_5O_3$ ,  $m/z$  300.0858  $\Delta m = 0.0008$  uma.



Experimento	Figura nº	Página nº
RMN de $^1H$	Figura 100	121

### Ácido lanesoico (6)

Aceite incoloro

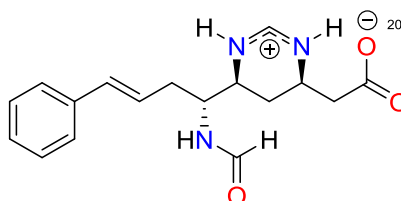
$[\alpha]_D +8.0^\circ$  (c 0.01, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  204, 251 y 283 nm

IR  $\nu_{\max}$  3374, 1677, 1369, 1202, 1153, 1085 y 1039  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  316  $[M+H]^+$  y 288  $[M-CHO]^+$  ver Figura 101

(+)-HRTOFMS  $m/z$  316.1657. Calculado para  $C_{17}H_{21}N_3O_3$ ,  $m/z$  316.1656  $\Delta m = 0.0001$  uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 102		125
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 103		125
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 14	126
RMN HSQC	Figura 104		127
RMN HMBC	Figura 106		128
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY	Figura 109		131
RMN de $^1\text{H}$	Figura 113		135
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 114		136
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY	Figura 115		136
RMN $^{15}\text{N}$ -HSQC	Figura 116 Figura 117		137

## Parte experimental Capítulo V

### Recolección de la muestra

La esponja Neopeltidae se recogió en Indonesia en 2014. No se pueden ofrecer más datos por motivos de confidencialidad.

### Extracción y fraccionamiento

La muestra se extrajo tres veces con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua. La extracción orgánica se purificó mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna Ascentis (10 x 150 mm 5 µm), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 40% MeOH/H<sub>2</sub>O durante 3 min seguido de gradiente del 40 hasta 65% de AcN/H<sub>2</sub>O en 25 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Cantidad (mg)	4.0	0.7	0.4	1.4	2.9	2.1	1.8
t <sub>R</sub> min	5	12	13	18.5	19.5	21.5	25
Compuesto		9	8		7		

### Enigmazol C (7)

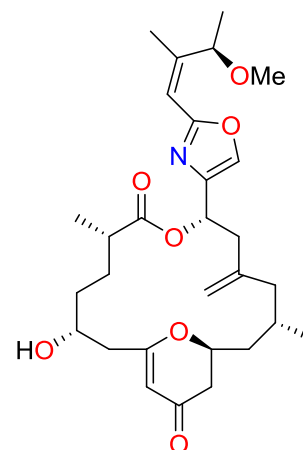
Aceite amarillento

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> 194 y 314 nm

IR u<sub>max</sub> 3378, 2966, 2311, 1675 y 1140 cm<sup>-1</sup>

(+)-ESIMS *m/z* 516 [M+H]<sup>+</sup> y 538 [M+Na]<sup>+</sup> ver Figura 122

(+)-HRTOFMS *m/z* 516.3033. Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>7</sub>, *m/z* 516.2956 Δ*m* = 0.0077 uma.



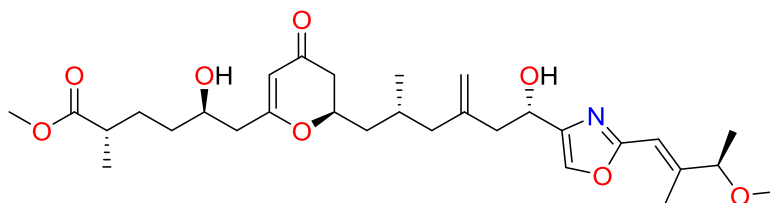
Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
-------------	-----------	----------	-----------



RMN de $^1\text{H}$	Figura 123	147
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 124	148
RMN HSQC	Figura 125	148
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$	Tabla 16	149
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 126	151
RMN 1D-TOCSY	Figura 127	152
RMN de HMBC	Figura 132	155
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY- Ampliado	Figura 146/Figura 150/ Figura 152	167/170/ 172
RMN 1D-TOCSY	Figura 142	165

### Compuesto 8

Aceite amarillento

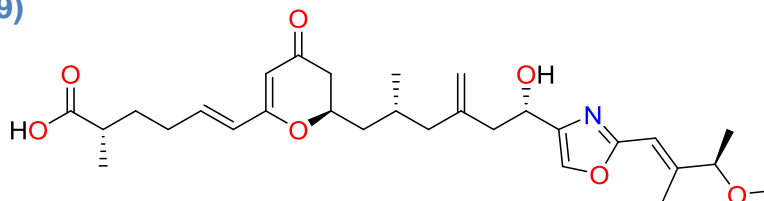


**(+)-ESIMS**  $m/z$  548  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ver Figura 134

**(+)-HRTOFMS**  $m/z$  548.3249. Calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{NO}_8$ ,  $m/z$  548.3218  $\Delta m = 0.0031$  uma.

Experimento	Figura nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 135	158
RMN HMBC-Ampliado	Figura 136	158

### Enigmazol D (9)



Aceite amarillento

**(+)-ESIMS**  $m/z$  516  $[M+H]^+$  y 538  $[M+Na]^+$  ver Figura 138

**(+)-HRTOFMS**  $m/z$  516.2932. Calculado para  $C_{29}H_{42}NO_7$ ,  $m/z$  516.2956  $\Delta m = 0.0024$  uma.

Experimento	Figura nº	Página nº
RMN de $^1H$	Figura 139	161
RMN $^1H$ - $^1H$ COSY-Ampliado	Figura 140	162

### Derivatización éster MTPA por método de Mosher

Se disuelve 1 mg de compuesto en  $C_5D_5N$  y se transfiere a un tubo limpio de resonancia. Se añaden 10  $\mu L$  de *R*-(-)-MTPA-Cl y se agita cuidadosamente. Una vez que la reacción ha finalizado (8 horas aprox.), se estudia mediante RMN. Se repite el proceso con el *S*-(-)-MTPA-Cl.

(*S*)-MTPA éster de **7**:  $^1H$  RMN (500 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  5.66 (s, H8), 5.56 (m, H5), 2.83 (dd,  $J = 13.7, 5.1$  Hz, H6<sub>l</sub>), 2.71 (m, H2), 2.64 (dd,  $J = 13.7, 7.2$  Hz, H6<sub>h</sub>), 1.79 (m, H4), 1.66 (m, H3), 1.15 (d,  $J = 6.8$  Hz, H26).

(*R*)-MTPA éster de **7**:  $^1H$  RMN (500 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  5.71 (s, H8), 5.57 (m, H5), 2.90 (dd,  $J = 13.8, 5.0$  Hz, H6<sub>l</sub>), 2.59 (m, H2), 2.74 (dd,  $J = 13.8, 7.0$  Hz, H6<sub>h</sub>), 1.71 (m, H4), 1.42 (m, H3), 1.07 (d,  $J = 6.8$  Hz, H26).

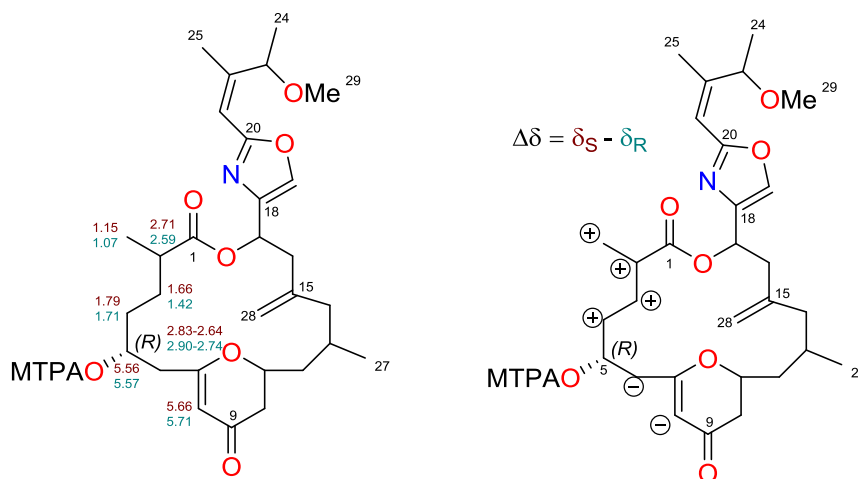


Figura 221. Determinación de la configuración absoluta de C5 en el compuesto 7.

(S)-MTPA éster de **8**:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$  6.60 (dd,  $J = 7.2, 7.2$  Hz, H17), 5.69 (m, H5), 5.67 (s, H21), 5.45 (d,  $J = 6.4$  Hz, H23), 4.92 (s, H28), 2.93 (m, H16), 2.68 (m, H6), 2.51 (m, H2), 2.18 (m, H14), 1.87 (s, H25), 1.86 (m, H3), 1.86 (m, H4), 1.12 (d, 7.0 Hz, H26), 0.91 (d, 5.9 Hz, H27).

(R)-MTPA éster de **8**:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$  6.62 (dd,  $J = 7.1, 7.1$  Hz, H17), 5.70 (m, H5), 5.66 (s, H21), 5.40 (d,  $J = 6.3$  Hz, H23), 5.04 (s, H28), 2.99 (m, H16), 2.73 (m, H6), 2.41 (m, H2), 2.24 (m, H14), 1.85 (s, H25), 1.73 (m, H3), 1.73 (m, H4), 1.04 (d, 7.0 Hz, H26), 0.93 (d, 5.9 Hz, H27).

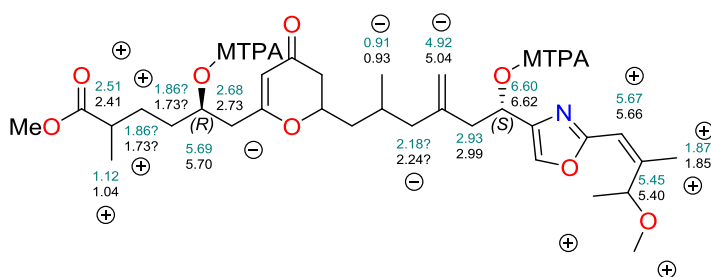


Figura 222. Determinación de la configuración absoluta de C17 en el compuesto 8.

## Parte experimental Capítulo VI

### Recolección de la muestra

Las esponjas *Haliclona (reniera)* sp. se recolectaron en mayo de 2011 en Timor Leste (Indonesia), cerca del fondeadero de Tunumanu (125° 32.978' E 08° 17.994' S) y en 2015 en el fondeadero de Mapia (124°45.965' E/01°27.574'N) mediante el uso del sistema de buceo rebreather entre los 0 y 50 m de profundidad. El estudio taxonómico de las esponjas se llevó a cabo en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la Dra. María Jesús Uriz Lespe. Las esponjas se codificaron como ORMA103258 y ORMA142266 respectivamente.

### Extracción y fraccionamiento

Los 30 g y 57 g se extrajeron tres veces con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua, obteniéndose 2.4 g y 3.0 mg de peso en seco del extracto orgánico y 0.3 g y 0.1 g del acuoso. Las fracciones orgánicas se pasaron por una placa filtrante con gel de sílice en fase invertida sometida a vacío (VLC-RP) utilizando diferentes mezclas de disolventes (puros o en mezcla 1:1) en orden decreciente de polaridad (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O:MeOH/MeOH/MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los pesos obtenidos de la extracción acuosa (A), la orgánica (DM) y las diferentes fracciones procedentes de la VLC-RP (RP1-5) son los siguientes:

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
0.3 g	2.4 g	335 mg	511 mg	87 mg	69 mg	186 mg

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
0.1 g	3.0 g	1.25 g	195 mg	270 mg	101 mg	50 mg

La fracciones RP3 se purificaron mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna XTerra Prep RP18 (10 x 150 mm 5  $\mu$ m), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 50% AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% AF durante 5 min seguido de gradiente del 50 hasta 100% de AcN/H<sub>2</sub>O + 0.1% AF en 25 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Cantidad (mg)	15.3	3.3	9.5	13.7	4.9	4.7	4.6	4.6
t <sub>R</sub> min	5	8	9	10.5	12.5	14	17.5	27
Compuesto	11		10					

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Cantidad (mg)	7	5.5	12.4	3.7	2.5	2.2	12.7	2.8	5.0
t <sub>R</sub> min	5	12.5	15	18	20.5	22	23.5	24.5	30.5
Compuesto	10			12					

### Halioxepina (10)

Cristal morado pálido

$[\alpha]_D +14.0^\circ$  (c 0.051, MeOH)

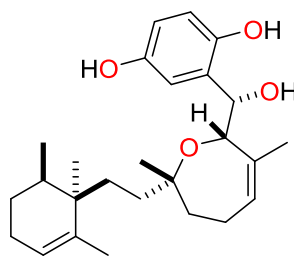
UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  205 y 293 nm

IR  $\nu_{\max}$  3356, 2962, 2922, 1505, 1456, 1377, 1238, 1078, 892 y 742  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  851  $[2M+Na]^+$ , 437  $[M+Na]^+$ , 397  $[M-OH]^+$  y 379  $[M-2OH]^+$

Figura 157

(+)-HRTOFMS  $m/z$  437.2655  $[M+Na]^+$ . Calculado para  $C_{26}H_{40}O_5Na$ ,  $m/z$  437.2662  $\Delta m = 0.0007$  uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1H$	Figura 158		184
Datos de $^1H$		Tabla 19	185

### Halioxepina B (11)

Cristal morado pálido

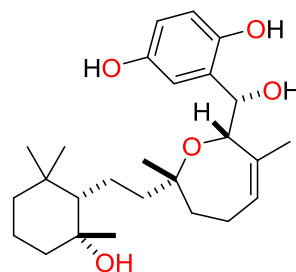
$[\alpha]_D +2.0^\circ$  (c 0.045, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  205 y 280 nm

IR  $\nu_{\max}$  2924, 2853, 2361, 2341, 1735, 1653, 1463, 1204, 1123 y 1073  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  455  $[M+Na]^+$  ver Figura 162

(+)-HRTOFMS  $m/z$  437.2655  $[M+H]^+$ . Calculado para  $C_{26}H_{40}O_5Na$ ,  $m/z$  455.2768  $\Delta m = 0.0113$  uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 163		191
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 164		191
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 21	192
RMN HSQC	Figura 165		193
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 167		194
RMN HMBC-Ampliado	Figura 169		196
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY-Ampliado	Figura 173		199
RMN HSQC-HECADE	Figura 175		200

### Halioxepina C (12)

Aceite marrón claro

$[\alpha]_{\text{D}} -23.6.0^\circ$  (c 0.053, MeOH)

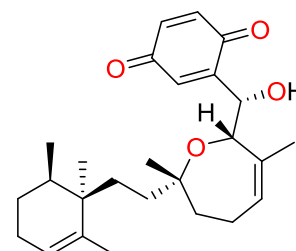
UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  247 y 301 nm

IR  $\nu_{\text{max}}$  3738, 3372, 2962, 2923, 2324, 1656, 1456, 1205, 947 y 833  $\text{cm}^{-1}$

(+)-ESIMS  $m/z$  435  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ver Figura 179

(+)-HRTOFMS  $m/z$  412.2652  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ,  $m/z$  412.2614

$\Delta m = 0.0038$  uma.



Experimento	Figura nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 180	203
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 181	203

### Derivatización éster MTPA por método de Mosher

Se disuelve 1 mg de compuesto en  $C_5D_5N$  y se transfiere a un tubo limpio de resonancia de 5 mm. Se añaden 10  $\mu L$  de *R*-(-)-MTPA-Cl y se agita cuidadosamente. Una vez que la reacción ha finalizado (6 horas aprox.), se estudia mediante RMN. Se repite el proceso con el *S*-(-)-MTPA-Cl.

Señales significativas de (*S*)-MTPA éster:  $^1H$  RMN (500 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  7.22 (dd,  $J = 8.6, 2.6$  Hz,  $H5'$ ), 7.01 (d,  $J = 8.7$  Hz,  $H6'$ ), 6.97 (dd,  $J = 2.6, 1.0$  Hz,  $H3'$ ), 6.69 (d,  $J = 1.6$  Hz,  $H1$ ), 5.67 (m,  $H4$ ), 4.68 (brs,  $H2$ ), 2.42 (m,  $H5$ ), 1.90 (s,  $H16$ ).

Señales significativas de (*R*)-MTPA éster:  $^1H$  RMN (500 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  7.36 (m,  $H3'$ ), 7.27 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz,  $H5'$ ), 7.03 (d,  $J = 8.6$  Hz,  $H6'$ ), 6.70 (d,  $J = 1.6$  Hz,  $H1$ ), 5.51 (m,  $H4$ ), 4.57 (s,  $H2$ ), 2.34 (m,  $H5$ ), 1.86 (d,  $J = 1.6$  Hz,  $H16$ ).

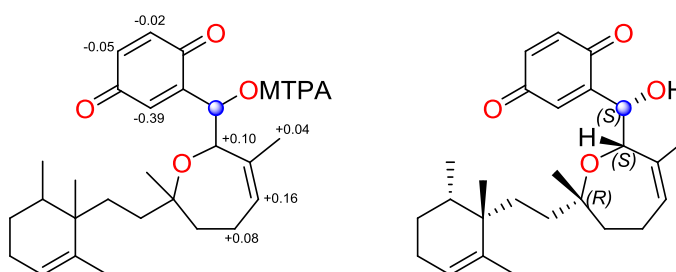


Figura 223. Análisis de los ésteres de MTPA de 12.



## Parte experimental Capítulo VII

### Recolección de la muestra

La esponja *Discodermia* sp. se recolectó en Haruku (Indonesia), en abril de 2014 cerca de Pulau Gunung (129°51.952'E 04°31.584'S) mediante el uso del sistema de buceo rebreather entre los 50 y 100 m de profundidad. El estudio taxonómico de la esponja, se llevó a cabo en el Centro de Estudios Avanzados de Blanes del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la Dra. María Jesús Uriz Lespe. La esponja se codificó como ORMA131384.

### Extracción y fraccionamiento

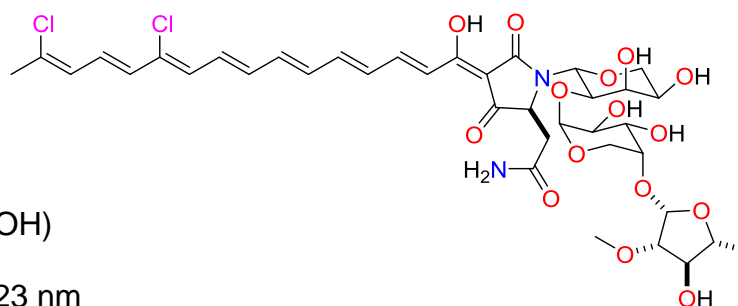
De los 242 g recogidos, se trabajaron 222 g que se extrajeron tres veces con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y una vez con agua, obteniéndose 6.5 g de peso en seco del extracto orgánico y 1.4 g del acuoso. La fracción orgánica se pasó por una placa filtrante con gel de sílice en fase invertida sometida a vacío (VLC-RP) utilizando diferentes mezclas de disolventes (puros o en mezcla 1:1) en orden decreciente de polaridad (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O:MeOH/MeOH/MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los pesos obtenidos de la extracción acuosa (A), la orgánica (DM) y las diferentes fracciones procedentes de la VLC-RP (RP1-5) son los siguientes:

A	DM	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5
1.4 g	6.5 g	4.4 g	477 mg	402 mg	162 mg	41 mg

La fracción RP3 se purificó mediante HPLC semipreparativo con las siguientes condiciones: columna Ascentis C18 (10 x 150 mm 5 µm), flujo 3 mL/min y como fase móvil isocrática de 20% AcN/H<sub>2</sub>O + 0.04% TFA durante 3 min seguido de gradiente del 20 hasta 100% de AcN/H<sub>2</sub>O en 20 min, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción	H1	H2	H3
Cantidad (mg)	14.0	23.9	91.8
t <sub>R</sub> min	9.0	17.5	Restos
Compuesto	14	13	

### Aurantosido E (13)



Sólido amorfo rojizo

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -1038° (c 0.001, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  250 y 423 nm

(+)-ESIMS  $m/z$  843/845 relación 3:1 [M+H]<sup>+</sup>, 865/867 relación 3:1 [M+Na]<sup>+</sup> y 1709 [2M+Na]<sup>+</sup> ver Figura 192

(+)-HRTOFMS  $m/z$  843.2608 [M+H]<sup>+</sup>. Calculado para C<sub>38</sub>H<sub>49</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub>,  $m/z$  843.2505  $\Delta m$  = 0.0103 uma.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
Datos de <sup>1</sup> H		Tabla 25	220
RMN de <sup>1</sup> H	Figura 193		221

**Gunungamida A (14)**

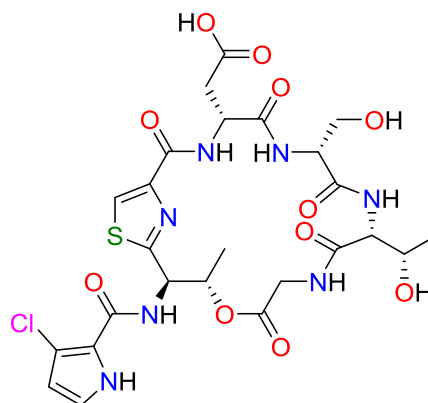
Aceite rojizo

**UV (MeOH)**  $\lambda_{\max}$  261 nm

**IR**  $\nu_{\max}$  3378, 2966, 2311, 1675 y 1140  $\text{cm}^{-1}$

**(+)-ESIMS**  $m/z$  672/674 relación 3:1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ver Figura 194

**(+)-HRTOFMS**  $m/z$  672.1518  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_7\text{O}_{11}\text{S}$ ,  $m/z$  672.1485  $\Delta m = 0.0033$  uma.



Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de $^1\text{H}$	Figura 195		224
RMN de $^{13}\text{C}$	Figura 196		224
Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$		Tabla 27	224
RMN HSQC	Figura 197		226
RMN TOCSY	Figura 199		227
RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	Figura 200		228
RMN HMBC-Ampliado	Figura 203		230
RMN LR-HSQMBC-Ampliado	Figura 204		231

**Ozonólisis**

Se disuelven 0.5 mg de compuesto en diclorometano y se burbujea una corriente de ozono hasta que la disolución toma coloración azul (15 min). El producto se evapora a sequedad.

### Derivatización con FDAA, método de Marfey

El compuesto **14** (1 mg) se hidroliza en una disolución de 6N de HCl a 110 °C durante 15 horas. Se evapora el disolvente bajo corriente de N<sub>2</sub>, se le añaden 700 µg de L-FDAA en acetona (160 µL) y NaHCO<sub>3</sub> 1N (50 µL). El vial se calienta a 40 °C durante 1 hora, y el contenido se neutraliza con una disolución de 2N de HCl (20 µL) después de enfriarlo a temperatura ambiente. La disolución se evapora a sequedad y se resuspende en H<sub>2</sub>O previa filtración. La solución acuosa obtenida se analiza mediante HPLC-ESIMS (Symmetry 10x150 mm, 5 µm, flujo 2,3 mL/min, H<sub>2</sub>O/AcN + 0.1%TFA desde 20 a 50% en 30 min). Las treoninas fueron analizadas en HPLCTOF (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm, flujo 0.65 mL/min, H<sub>2</sub>O/AcN + 0.1%TFA desde 10 a 25% en 30 min).

---

**TRABAJOS Y COMUNICACIONES PESENTADAS EN CONGRESOS Y PUBLICADAS EN REVISTAS CIENTÍFICAS.****Congresos:**

- "Linking Stereoclusters by DFT Studies: Halioxepine B, a New Cytotoxic Terpene from the Indian Ocean Sponge Haplosclerida. G. Tarazona." XXXV Bienal RSEQ, 19-23/07/2015. A Coruña. Comunicación oral.
- "Theoenellatetrahydropyrimidine, unprecedent cytotoxic alkaloid from Theonella sp." M. Blanco, J. Rodríguez, C. Jiménez, G. Tarazona, R. Fernández, Carmen Cuevas. XXXV Bienal RSEQ, A Coruña 19-23/07/2015. Póster.
- "Cytotoxic anomoian B and aplyzanzine B, new bromotyrosine alkaloids from two Indonesian sponges." Guillermo Tarazona, Patricia G. Cruz, Rogelio Fernández, Marta Pérez, Carmen Cuevas, Jaime Rodríguez and Carlos Jiménez. The 9th European Conference on Marine Natural Products. Glasgow 30/08/2015-02/09/2015. Póster.
- "Aislamiento y Elucidación de Enigmazole C, un Nuevo Macrólido Citotóxico Procedente de la Esponja de la Familia Neopeltidae." J. Rodríguez, G. Tarazona, R. Fernández, M. Pérez, C. Cuevas y C. Jiménez. XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica de la RSEQ. Huelva 14-17/06/2016. Comunicación oral.
- "Combinación de los métodos JBCA y de Marfey para la determinación de la estereoquímica en aminoácidos. Aplicación en los ciclopéptidos de origen natural Gunungamide A y Stellatolide A." G. Tarazona, R. Fernández, P. G. Cruz, M. Pérez, J. Rodríguez, C. Jiménez, y C. Cuevas. XXXVI Bienal RSEQ, 25-29/06/2017. A Coruña. Comunicación oral.

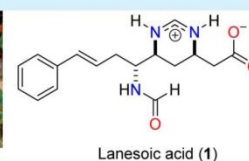
### Publicaciones:

- "Lanesoic Acid: A Cytotoxic Zwitterion from Theonella sp." J. Rodríguez, C. Jiménez, M. Blanco, G. Tarazona, R. Fernández and C. Cuevas, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 5832–5835.
- "Cytotoxic Anomoian B and Aplyzanzine B, New Bromotyrosine Alkaloids from Indonesian Sponges." G.Tarazona, G. Santamaría, P. G. Cruz, R. Fernández, M. Pérez, J. Martínez Leal, J. Rodríguez, C. Jiménez y C. Cuevas. Aceptado en ACS Omega.
- "Linking Stereoclusters by DFT Studies: New Halioxepines, Cytotoxic Meroditerpenes from Indian Ocean Sponges Haliclona (Reniera) sp." G.Tarazona, G. Benedit, R. Fernández, M. Pérez, J. Rodríguez, C. Jiménez y C. Cuevas. Manuscrito enviado.
- "Combining JBCA methodology and Marfey's analysis to determine the absolute configuration of Threonines in Gunungamide A, a new Chloropyrrole containing cyclic depsipeptide from Discodermia sp." G.Tarazona, R. Fernández, P. G. Cruz, M. Pérez, J. Rodríguez, C. Jiménez and C. Cuevas. Manuscrito enviado.
- "Enigmazoles C-E, New Cytotoxic Macrocycles from the Indonesian Sponge Neopeltidae." G.Tarazona, R. Fernández, M. Pérez, J. Rodríguez, C. Jiménez y C. Cuevas. Manuscrito enviado.

Lanesoic Acid: A Cytotoxic Zwitterion from *Theonella* sp.Jaime Rodríguez,<sup>\*,†</sup> Carlos Jiménez,<sup>\*,†</sup> María Blanco,<sup>†</sup> Guillermo Tarazona,<sup>‡</sup> Rogelio Fernández,<sup>‡</sup> and Carmen Cuevas<sup>‡</sup><sup>†</sup>Departamento de Química Fundamental, Facultade de Ciencias e Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) Rua As Carballeiras s/n, Universidade da Coruña, 15071 A Coruña, Spain<sup>‡</sup>Natural Products Department, PharmaMar S.A., Pol. Ind. La Mina Norte, Avda de los Reyes 1, 28770 Colmenar Viejo, Spain

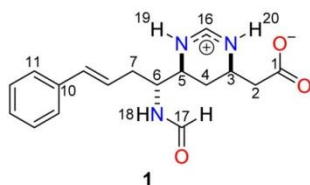
## Supporting Information

**ABSTRACT:** Lanesoic acid (**1**) was isolated and characterized from *Theonella* sp. during PharmaMar's ongoing program to study cytotoxic substances from marine sources. Its planar structure, elucidated by spectral analysis (NMR, IR, UV, and MS), possesses an unusual skeleton containing a tetrahydropyrimidine cation that is stabilized as a zwitterion by an internal carboxylate counterion. The stereostructure of **1** was deduced from ROESY-NOESY, *J*-based configurational analysis (JBCA), and density functional theory (DFT) computational calculations fitted using the recently published DP4+ parameter. Compound **1** was moderately active and selective against pancreas PSN1 cells (IC<sub>50</sub> = 8.9 μg/mL) and inactive against colon HT-29, breast MD-MB-23, and NSCLC lung tumor cells.



Sponges of the genus *Theonella* are a rich and diverse source of secondary metabolites with interesting biological activities,<sup>1</sup> with *Theonella swinhoei* the most studied among them. Although most of them are peptides,<sup>2</sup> it is not unusual to find macrocycles,<sup>3</sup> alkaloids,<sup>4</sup> and steroids.<sup>5</sup> Recent studies indicate that this diversity could be due to symbiotic microorganisms.<sup>6,7</sup>

As part of the PharmaMar antitumor screening program of marine organisms, a sponge belonging to the *Theonella* genus collected at Lanes in Indo-Pacific<sup>8</sup> was selected due to the cytotoxic activity against human tumor cell lines shown by its organic extracts. The active CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>OH extract was submitted to bioassay-guided fractionation by solvent partition RP-18 VLC chromatography followed by reversed-phase HPLC, affording three known compounds (microsclerodermin **C**,<sup>9</sup> cupolamide **A**,<sup>10</sup> and kumusine<sup>11</sup>/trachycladine **A**<sup>12</sup>) along with a new alkaloid containing an uncommon 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine cation which is stabilized as a zwitterion by an internal carboxylate counterion.



The molecular formula of compound **1** was established by HRESTOFMS as C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> based on the molecular ion parent at *m/z* 316.1657 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> *m/z* 316.1656). The analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data in combination with HSQC data obtained in CD<sub>3</sub>OD (Table 1) revealed the existence of two carbonyl groups, a carboxylic

acid (δ<sub>C</sub> 173.6) and a formamide (δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub> 164.4/8.19) group, along with a methine (δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub> 153.0/7.88), a monosubstituted benzene

**Table 1.** NMR Data of Compound **1** at 500 (<sup>1</sup>H) and 125 (<sup>13</sup>C) MHz

no.	δ <sub>H</sub> , mult, J (Hz) <sup>a</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b</sup>	δ <sub>C</sub> <sup>c</sup>
1			173.6
2	2.71 dd, 17.2, 5.5	2.71 m	38.6
	2.62 dd, 7.9, 17.2		
3	3.94 m	3.91 m	47.6
4eq	2.33 ddd, 13.4, 3.8, 3.8	2.22 m	28.9
4ax	1.60 ddd, 13.5, 1.2, 11.2	1.57 m	
5	3.73 ddd, 11.1, 6.6, 3.8	3.74 m	53.3
6	4.19 ddd, 8.6, 6.6, 4.9	4.24 m	51.3
7	2.56 ddd, 13.9, 5.5, 4.9	2.56 m	34.8
	2.40 ddd, 13.9, 8.6, 8.6		
8	6.14 ddd, 15.8, 8.6, 5.5	6.19 ddd, 15.9, 7.1, 7.1	125.5
9	6.49 d, 15.8	6.52 d 15.9	134.9
10			138.5
11	7.31, d, 7.6	7.39 d 7.0	127.2
12	7.23, t, 7.6	7.32 t 7.0	129.6
13	7.15, t, 7.6	7.15 t 7.0	128.5
14	7.23, t, 7.6	7.32 t 7.0	129.6
15	7.31, d, 7.6	7.39 d 7.0	127.2
16	7.88, s	7.88 s	153.0
17	8.19, d, 2.7	8.16 s	164.4
18 NH	8.33, d, 9.2 <sup>c</sup>	7.52, d, 9.4	
19 NH	9.62, bs <sup>c</sup>	9.84 bs	
20 NH		8.75 bs	

<sup>a</sup>In CD<sub>3</sub>OD. <sup>b</sup>In CD<sub>3</sub>CN. <sup>c</sup>In CD<sub>3</sub>OH.

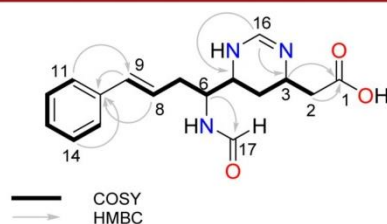
Received: September 20, 2016

Published: November 1, 2016



ring [ $\delta_{\text{C}}$  127.2 (C11/C15), 128.5 (C13), 129.6 (C12/C14), and 138.5 (C10),  $\delta_{\text{H}}$  7.15 (H13), 7.23 (H12/H14) and 7.31 (H11/H15)], one disubstituted double bond ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  125.5/6.14, 134.9/6.49), three methines bearing heteroatoms ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  47.6/3.94, 53.3/3.73, 51.3/4.19), and three methylenes ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  38.6/2.71 and 2.62, 28.9/2.33 and 1.60, 34.8/2.56 and 2.40). Two more signals corresponding to interchangeable protons ( $\delta_{\text{H}}$  8.33 and 9.62) were observed when the  $^1\text{H}$  NMR spectrum was recorded in  $\text{CD}_3\text{OH}$  and three (9.84, 8.75 and 7.52) in  $\text{CD}_3\text{CN}$  instead of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

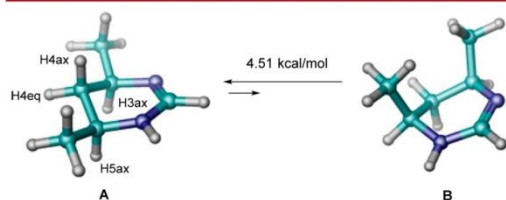
Analysis of COSY and TOCSY spectra of **1** showed the presence of two spin systems (from C2 to C9 and from C11 to C15), which were connected through HMBC correlations for H8, H9, and H12/H14 to the quaternary aromatic carbon C10 and between H11/H15 and the olefinic methine carbon C9 (Figure 1). The carboxylic acid and formamide groups were



**Figure 1.** Important correlations observed in the NMR data of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

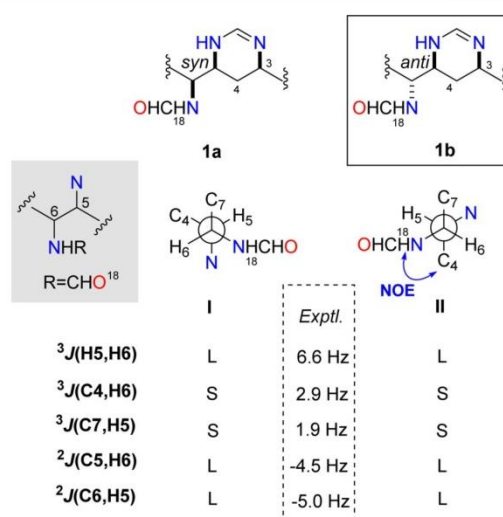
linked to the main framework by cross-peaks observed in the HMBC spectrum for H2 and H3 to carbonyl carbon C1 and between H6 and carbonyl carbon C17. Finally, the presence of a tetrahydropyrimidine ring was suggested by the chemical shifts in  $\text{CD}_3\text{CN}$  at 7.88/153.0 ppm (C16) characteristic of a methine surrounding by two nitrogen atoms, along with the HMBC correlations for H16 to the methine carbons C3 and C5 and the COSY cross peaks between H-16 and NH at 9.84 ppm.

The *E* configuration of the  $\Delta^{8,9}$  double bond was established on the basis of the large coupling constant ( $J = 15.8$  Hz) between the olefinic protons H8 and H9. The relative stereochemistry of the tetrahydropyrimidine ring was defined by a combination of  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  coupling constant analysis, conformational studies by molecular mechanics calculations (Figure 2),



**Figure 2.** Conformational study of *syn*-1,4-dimethyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine.

and the correlations observed in a ROESY experiment (Figure 3). Thus, the large coupling constants of H4ax with H3 ( $J = 13.4$  Hz) and with H5 ( $J = 10.7$  Hz), suggesting a pseudoaxial orientation for all three protons, along with a ROE correlation observed between H3 and H5, were indicative of a *cis* relative stereochemistry between those protons in the tetrahydropyrimidine ring.



**Figure 3.** Conformers around C5–C6 bond compatible with the JBCA.

This proposal was corroborated by *J*-based configurational analysis (JBCA). The expected large values for the  $^3J(\text{H}_3\text{H}_{4\text{ax}})$  and  $^3J(\text{H}_{4\text{ax}}\text{H}_5)$  coupling constants and the set of values for  $^3J(\text{C}_2\text{H}_{4\text{ax}})$ ,  $^3J(\text{C}_2\text{H}_{4\text{eq}})$ ,  $^3J(\text{C}_5\text{H}_3)$ ,  $^2J(\text{C}_3\text{H}_{4\text{ax}})$ ,  $^2J(\text{C}_3\text{H}_{4\text{eq}})$ ,  $^3J(\text{C}_3\text{H}_5)$ ,  $^3J(\text{C}_6\text{H}_{4\text{ax}})$ ,  $^3J(\text{C}_6\text{H}_{4\text{eq}})$ ,  $^2J(\text{C}_5\text{H}_{4\text{ax}})$ , and  $^2J(\text{C}_5\text{H}_{4\text{eq}})$  also support the *syn* orientation for these carbons. Furthermore, a conformational study for the *syn*-1,4-dimethyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine showed the presence of a half-chair conformer that proved to be 4.51 kcal/mol more stable than a twisted-chair conformer in which the two substituents are in pseudoaxial positions (see Figure 2). All of these data allowed us to define the relative configuration as  $3R^*,5S^*$  for these positions.

The most intriguing feature of the structural elucidation of the new compound was to establish the relative stereochemistry around C5–C6. The presence of the *anti* diastereoisomer **1b** instead of *syn*-**1a** (Figure 3) was deduced by a combination of JBCA, NOE correlations, and DFT-NMR calculations.

The large value for the homonuclear coupling constant  $^3J(\text{H}_5\text{H}_6)$  suggested the presence of a single rotamer with both protons in an antiperiplanar arrangement. The small value of  $^3J(\text{C}_7\text{H}_5)$  indicated that C7 and H5 are positioned in a synclinal disposition, while the large values of  $^2J(\text{C}_5\text{H}_6)$  and  $^2J(\text{C}_6\text{H}_5)$  suggested that the nitrogen atoms attached to C5 and C6 also have a synclinal disposition to H6 and H5, respectively.

Finally, the small  $^3J(\text{C}_4\text{H}_6)$  value completed a set of values that matches with conformer I corresponding to the *syn* diastereoisomer **1a** and conformer II of the *anti* diastereoisomer **1b** (Figure 3). The observed NOE correlations between H6/H4 and H18/H4 only present in conformer II, where the protons of C4, H18, and H5 are close in space, allowed us to establish the *anti* relative configuration around the C5–C6 bond.

Taking into account that the flexibility of the formamide group at C6 could give an NOE interaction between neighboring groups in the space of possible conformers of the *syn* configuration of **1a** (see the Supporting Information), we wanted to confirm the proposed *anti* relative stereochemistry



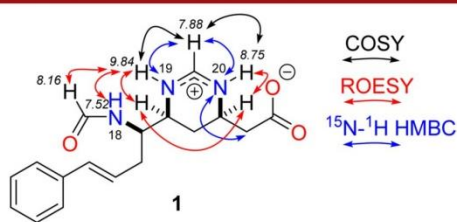
around the C5–C6 bond by using a DFT-NMR approach. Both possible diastereoisomers (**1a** and **1b**) were first submitted to a conformational search with the MacroModel program using the protocol developed by Hoye et al.<sup>13</sup> Having reached 68 conformers for **1a** and 52 for **1b** in a 3.0 kcal/mol window, the DFT calculations were performed using the combination B3LYP/6-31+G(d,p) for energy/frequencies and MPW1PW91/6-311+G(2d,p) for chemical shifts.

The sets of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts were compared by mean absolute error (MAE), R<sup>2</sup> of  $\delta_{\text{calcd}}/\delta_{\text{exp}}$  by the linear regression of calculated ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) and by the statistical DP4 parameter developed by Goodman and co-workers.<sup>15</sup> A 100% probability DP4 value in favor to **1b** was concordant with the *anti* (**1b**) relative stereochemistry of the new compound. Moreover, comparison of the computed calculated proton and carbon data for **1a** and **1b** with the experimental data obtained using the improved modified probability DP4+ parameter, recently published by Sarotti and co-workers,<sup>16</sup> also gave a 99% probability for the disposition *anti* as **1b**.

A zwitterion structure was proposed for **1** from the NMR data taken in CD<sub>3</sub>CN (Table 1). The <sup>1</sup>H NMR spectrum in this deuterated solvent showed three extra signals that resonated as broad singlets at  $\delta_{\text{H}}$  7.52 (NH formamide), 8.75 (NH-20), and 9.84 (NH-19). These assignments were based on <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY and ROESY correlations. Thus, a <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY experiment revealed that  $\delta_{\text{H}}$  9.84 (NH-19) and 8.75 (NH-20) signals showed cross peaks to H16 ( $\delta_{\text{H}}$  7.88, brs). Additionally, the ROESY experiment displayed NOE correlations from H16 at 7.88 ppm (brs) to 9.84 ppm (NH-19) and 8.75 ppm (NH-20) signals, between  $\delta_{\text{H}}$  9.84 and H5 at 3.74 ppm, and between NH formamido at  $\delta_{\text{H}}$  7.52 and 8.16 ppm (H17) signals.

A <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H HSQC experiment in CD<sub>3</sub>CN clearly demonstrated the zwitterionic nature of compound **1**. The chemical shifts for N20 and N19 showed similar values ( $\delta_{\text{N}}$  122.3/ $\delta_{\text{H}}$  8.75 and  $\delta_{\text{N}}$  119.4/ $\delta_{\text{H}}$  9.84 ppm) and therefore a similar hybridization. <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H HMBC correlations specifically acquired with a *J* value of 10 Hz, showed correlations between both N20, N19, and H16 and between N20 and H2 protons.

All these observations, along with the strong ion peak observed in the (+)-ESIMS spectrum, are compatible with a zwitterion structure with a positive charge delocalized between the two nitrogen atoms of the tetrahydropyrimidine ring and the negative charge located on the carboxylate moiety at C1 (see Figure 4).<sup>17</sup>



**Figure 4.** <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H ROESY, and <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H HMBC key correlations in CD<sub>3</sub>CN of lanesoic acid (**1**).

In the solid state, lanesoic acid (**1**) appears to exist in the zwitterionic form, shown by an IR absorption at 1677 cm<sup>−1</sup> consistent with a carboxylate or an imino moiety. Despite a 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine ring being reported in a natural product for the first time in ectoine, obtained from a species of

the bacterial genus *Ectothiorhodospira*,<sup>18</sup> and 5-hydroxyectoine produced by *Streptomyces parvulus*,<sup>19</sup> and later, in manzacidins, isolated from the sponge *Hymeniacidon* sp.,<sup>20</sup> a zwitterion structure as a  $\beta$ -amino acid was never observed in any of these compounds. We propose that the presence of the 2-acetyl moiety in **1**, instead of the carboxylic acid found at the same position in the heterocycle ring of the manzacidins and ectoine derivatives, promotes formation of a six-membered hydrogen-bonded structure that favors the zwitterion structure.

Biosynthetically, the tetrahydropyrimidine ring and the formamido moiety in lanesoic acid (**1**) might have been generated from two formic acid units and a 3,5,6-triamino  $\omega$ -phenylnon-8-enoic acid which in turn could be originated from transamination of an  $\omega$ -phenylalkenoid acid derivative. The biosynthetic formation of tetrahydropyrimidine ring through the condensation of a diamino compound with formic acid was first proposed in manzacidins A–C that bear the same heterocycle ring.<sup>20</sup> On the other hand,  $\omega$ -phenylalkenoid acids, aromatic fatty acids with a phenyl unit on the terminal carbon of the acyl chain, are scarcely found in the literature. For example, they have been previously isolated from seed lipids of various genera of the subfamily Araceae of Araceae,<sup>21</sup> from butter fat samples,<sup>22</sup> as well as from a bacterium (*Vibrio alginolyticus*) associated with the marine alga *Cladophora coelothrix*.<sup>23</sup> The biosynthetic origin of aromatic fatty acids has been subjected to several studies.<sup>24</sup>

Lanesoic acid (**1**) was tested against pancreas PSN1, colon HT-29, breast MD-MB-231, and NSCLC lung tumor cells A549. The results showed that compound **1** has moderate cytotoxicity against pancreas tumor cells with an IC<sub>50</sub> value of 8.9  $\mu$ g/mL but that it is inactive against the other three tumor lines. This highlights the interesting selective antitumor activity displayed by **1**.

In summary, a new zwitterionic alkaloid, lanesoic acid (**1**), containing an unusual 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine cation was isolated from a sponge belonging to *Theonella* genus collected in Indonesia. Its structure, including its relative configuration, was established by an extensive spectral analysis along with *J*-based configurational analysis and DFT computational calculations. Compound **1** showed selective, moderate cytotoxic activity against pancreas tumor cells in a panel of different tumor cell lines.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.orglett.6b02832.

<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC, HMBC, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H-NOESY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H ROESY, HSQC-HECADE, <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H HSQC, and HMBC spectra and MS of **1** (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: jaime.rodriguez@udc.es.

\*E-mail: carlos.jimenez@udc.es.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The present research was financed in part by Grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (AGL2015-63740-C2-2-R). J.R. and C.J. acknowledge Xunta de Galicia and

CESGA for the computational facilities. We gratefully acknowledge the help of our PharmaMar colleagues, C. de Eguilior for collecting the marine sample, S. González for performing the MS experiments, and S. Munt for revision of the manuscript.

## REFERENCES

- (1) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 382–431.
- (2) Sinisi, A.; Calcinai, B.; Cerrano, C.; Dien, H. A.; Zampella, A.; D'Amore, C.; Renga, B.; Fiorucci, S.; Tagliatela-Scafati, O. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1643–1651.
- (3) Carmely, S.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 511–514.
- (4) Kobayashi, J.; Kondo, K.; Shigemori, H.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Mikami, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6680–6682.
- (5) Umeyama, A.; Shoji, N.; Enoki, M.; Arihara, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 296–298.
- (6) Winder, P. L.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2643–2682.
- (7) Wilson, M. C.; Mori, T.; Ruckert, C.; Uria, A. R.; Helf, M. J.; Takada, K.; Gernert, C.; Steffens, U. A. E.; Heycke, N.; Schmitt, S.; Rinke, C.; Helfrich, E. J. N.; Brachmann, A. O.; Gurgui, C.; Wakimoto, T.; Kracht, M.; Crusemann, M.; Hentschel, U.; Abe, I.; Matsunaga, S.; Kalinowski, J.; Takeyama, H.; Piel, J. *Nature* **2014**, *506*, 58–62.
- (8) (a) Rodríguez, J.; Nieto, R. M.; Hunter, L.; Crews, P. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11079–11090. (b) Crews, P.; Jimenez, C.; O'Neil-Johnson, M. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3585–3600.
- (9) Schmidt, E. W.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3043–3056.
- (10) Bonnington, L. S.; Tanaka, J.; Higa, T.; Kimura, J.; Yoshimura, Y.; Nakao, Y.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7765–7767.
- (11) Ichiba, T.; Nakao, Y.; Scheuer, P. J.; Sata, N. U.; Kelly-Borges, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3977–3980.
- (12) Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4296–4298.
- (13) (a) Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 643–660. (b) Rodríguez, J.; Cen-Pacheco, F.; Norte, M.; Fernández, J. J.; Hernández-Daranas, A. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 8525–8532. (c) Rodríguez, J.; Nieto, R. M.; Blanco, M.; Valeriote, F. A.; Jiménez, C.; Crews, P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 464–467.
- (14) Saielli, G.; Nicolaou, K. C.; Ortiz, A.; Zhang, H.; Bagno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6072–6077.
- (15) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946–12959. See <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>.
- (16) (a) Grimblat, N.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12526–12534. (b) Grimblat, N.; Sarotti, A. M. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 12246–12261.
- (17) Dega-Szafran, Z.; Dulewicz, E.; Szafran, M. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 43–50.
- (18) Galinski, E. A.; Pfeiffer, H.-P.; Trüper, H. G. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 135–139.
- (19) (a) Inbar, L.; Lapidot, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16014–16022. (b) Inbar, L.; Frolov, F.; Lapidot, A. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 897–906. (c) Castellanos, L.; Duque, C.; Zea, S.; Espada, A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4967–4970.
- (20) Kobayashi, J.; Kanda, F.; Ishibashi, M.; Shigemori, H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4574–4576.
- (21) Meija, J.; Soukup, V. G. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2229–2237.
- (22) Schröder, M.; Abdurahman, H.; Ruoff, T.; Lehnert, K.; Vetter, W. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 1695–1702.
- (23) Carballera, N. M.; Sostre, A.; Stefanov, K.; Popov, S.; Kujumigiev, A.; Dimitrova-Konaklieva, S.; Tosteson, C. G.; Tosteson, T. R. *Lipids* **1997**, *32*, 1271–1275.
- (24) Patton, S.; Kesler, E. M. *J. Dairy Sci.* **1967**, *50*, 1505–1508.